

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química

Crescimento dos Agregados Micelares em Complexos de Albumina do Soro Bovino – Dodecilsulfato de Sódio Controlado pela Proteína

Bianca Schweitzer

Dissertação de Mestrado

Orientador: Professor Doutor Dino Zanette

Florianópolis, Julho de 2003.

Dedicatória

Talvez haja mais compreensão e beleza na vida, quando os raios ofuscantes do sol forem suavizados pelos contornos da sombra. Talvez haja raízes mais profundas numa amizade que sofreu tempestade e as venceu.

A experiência que nunca desaponta ou entristece, que nunca toca nos sentimentos, é uma vivência neutra, com pequenos desafios e variações de cor. Quando sentimos confiança, fé e esperança de que podemos concretizar nossos objetivos, isto constrói dentro de nós um manancial de força, coragem e segurança.

Especialmente aos meus pais,
Paulo César Schweitzer e Izete Santos Schweitzer,
E minha irmã, Ana Paula Schweitzer,
Pelo carinhoso e imensurável apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Professor Dino Zanette, por todos os conhecimentos transmitidos, e acima de tudo pela sincera amizade adquirida ao longo deste tempo, minha admiração.

A professora Rosângela Itri, do departamento de Física Aplicada do Instituto de Física da USP, por toda a colaboração prestada para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pela participação.

A minha família, por toda compreensão, amor e acima de tudo confiança que foram em mim confiadas.

Ao Thiago, pelo amor sincero e apoio que recebi sempre que precisei.

Um agradecimento especial ao Jadir e a Graça pela amizade e serviços prestados.

A todos os amigos, em especial ao Ângelo, LÍlian, Rodrigo, Luciano, Fabio, Cristiano, que compartilharam meus medos e alegrias.

Aos colegas e amigos de laboratório 205 e 305 por todos os auxílios prestados e pela amizade compartilhada.

A todos os professores, que de alguma forma contribuíram para o meu aprendizado.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao Laboratório Nacional de Luz Sincrotron – LNLS pelo espaço físico para realização das medidas de SAXS.

A Deus, por toda força e sabedoria.

ÍNDICE GERAL

“A química cria seus próprios temas. Esta habilidade criativa, similar à arte, essencialmente a distingue de outras ciências naturais”

M. Berthelot (1827 – 1907)

Índice de Figuras	VI
Índice de Tabelas	VIII
Resumo	IX
Abreviaturas	X
Capítulo I	1
Introdução	1
1. Surfactantes	1
1.1. Micelas	2
2. Proteínas _ Albumina do Soro Bovino (BSA)	4
2.1. Interações proteína-surfactante	6
2.2. Efeito salino	12
3. Definições das técnicas	13
3.1. Tensão superficial	13
3.2. Medidas de condutividade de complexos BSA-SDS	14
3.3. Medidas de fluorescência	15
3.4. Medidas de Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos	18
Objetivos	21

Capítulo II	22
Parte Experimental	22
1.Materiais	22
1.1.Reagentes	22
2.Equipamentos e Métodos	23
 Capítulo III	 25
Resultados e Discussão	25
1.Conductividade elétrica	25
2.Tensão superficial	29
3. Fluorescência da BSA	34
3.1. Medidas de número de agregação	37
4.Medidas de SAXS	42
 Capítulo IV	 48
Conclusão	48
 Capítulo V	 49
Perspectivas	49
Proposta de trabalho	51
 Referencias Bibliográficas	 53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01:	Formação de micelas em solução	3
Figura 02:	Corte de uma micela esférica, segundo modelo proposto por Gruen	4
Figura 03:	Estrutura cristalográfica da HSA	6
Figura 04:	Representação esquemática da interação proteína-surfactante	8
Figura 05:	Modelos discutidos para o complexo Proteína-Surfactante (a- Modelo de colar de pérolas; b- Modelo tipo bastão; c- Modelo de hélice flexível; 6 d- Modelo colar de pérolas elipsoidais)	9
Figura 06:	Ilustração do processo de associação dos agregados micelares segundo Turro e Lei	10
Figura 07:	Mostra um gráfico de tensão superficial versus concentração do surfactante e o momento em que se tem a cmc do surfactante	14
Figura 08:	Mostra um gráfico de condutividade elétrica versus concentração do surfactante na presença de polímero	15
Figura 09:	Diagrama de energia	16
Figura 10:	Estrutura do triptofano (W)	17
Figura 11:	Função distribuição de distâncias $p(r)$ para partículas com distribuição de densidade eletrônica homogênea	20
Figura 12:	Gráfico de condutividade elétrica de SDS com 1,0% de BSA, em 10 mM de acetato, em pH 5,40 e, no detalhe, em apenas água	26
Figura 13:	Gráfico de Tensão Superficial <i>versus</i> log [SDS] com 20 mM de acetato, (●)na ausência e em (●) em 1,0% de BSA, em pH 5,40 e a 25°C	30
Figura 14:	Gráfico de Tensão Superficial <i>versus</i> log [SDS] com 1,0% de BSA e em (▲)20 mM (◆)200 mM (■)500 mM de acetato, em pH 5,40 e a 25°C	31

Figura 15:	Gráfico de Tensão superficial em função da concentração de BSA (%), em 20mM de acetato e em pH 5,4	33
Figura 16:	Áreas normalizadas do espectro de emissão da BSA em tampão Succinato 20 mM em função da [SDS]	35
Figura 17:	Gráfico de $\ln(I_0/I)$ versus concentração do supressor (MA), em presença de 1% de BSA e 50 mM de acetato, pH 5,4 em [SDS] de (●) 20 mM, (♦) 30 mM, (◆) 50 mM e (●) 100mM	38
Figura 18:	Valores de número de agregação obtidos para diferentes [tampão], para agregados micelares de SDS em (◆)50 mM de SDS e na ausência de BSA e em presença de 1% de BSA em diferentes [SDS]: (■) 20, (□) 30, (●) 45, (○) 50, (▲)80, (△) 100mM	39
Figura 19:	Curva de SAXS para soluções compostas por 1% de BSA, em (▽) 20 mM e em (□)500 mM de acetato, e em ausência de SDS	43
Figura 20:	Curva de SAXS para soluções compostas por 1% de BSA, em (●) ausência e em (●)50 mM de acetato, em 20 mM de acetato	44
Figura 21:	Funções $p(r)$ obtidas para (a) 1,0% de BSA em pH=5,40 com $D_{\text{máx}}=100 \text{ \AA}$ e $R_g = 32 \pm 0,3 \text{ \AA}$ e (b) 1,0 % de BSA em presença de 5 mM de SDS com $D_{\text{máx}}=130 \text{ \AA}$ e $R_g = 39 \pm 0,7 \text{ \AA}$	45
Figura 22:	Curva de SAXS para soluções compostas por 1% de BSA, em (●) 20 mM (●) 50 mM (●) 200 mM e (●) 500 mM de acetato, pH 5,4 e em 50 mM de SDS	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01:	Alguns exemplos de surfactantes quanto a classificação	2
Tabela 02:	Propriedades físico-químicas da Albumina	5
Tabela 03:	Sistemas formados por SDS e diferentes proteínas	11
Tabela 04:	Valores de Coeficientes angulares e grau de ionização obtido por condutividade elétrica	28
Tabela 05:	Valores de área molecular	32

Resumo

Surfactantes aniônicos, como o dodecilsulfato de sódio (SDS), ligam-se fortemente em proteínas induzindo desnaturação. Com a proposta de melhor entender as características dos complexos BSA-SDS na saturação da proteína por surfactante, por tensão superficial, foi acompanhado o efeito da força iônica na saturação *via* variação da concentração de tampão acetato. A premissa desta proposta está baseada no fato de que, se os agregados estão sujeitos a efeitos por mudanças de força iônica, necessariamente espera-se mudanças na saturação da BSA por SDS.

As experiências foram executadas em diferentes concentrações de acetato, 20-500 mM, pH 5,40 e em presença de 1% de BSA. Observou-se que os perfis de tensão superficial *versus* [SDS] exibem o mesmo clássico comportamento como quando em misturas de polímeros em geral e surfactantes. Os perfis apresentam dois pontos de descontinuidade, usualmente denominados de concentração crítica de agregação, *cac*, e ponto de saturação, *psp*. Contrariamente ao esperado, observou-se que, tanto a *cac* em 3,3 mM como o *psp* em 42 ± 2 mM, não são, rigorosamente, afetados por aumento da força iônica. Medidas de fluorescência da proteína indicam que os surfactantes se ligam cooperativamente nos sítios da proteína onde se encontram os resíduos de triptofano. As curvas de SAXS, executadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), foram obtidas variando a intensidade do espalhamento de raio-X, de λ igual a 1,608 Å, em 1% de BSA. Curvas em 50 mM de SDS, portanto, próximas da saturação da proteína, indicam que o efeito salino praticamente não afeta o tamanho e forma dos complexos BSA-SDS.

Utilizado técnica de fluorescência estacionária, foram medidos os valores de número de agregação em função da concentração de tampão e de surfactante. Os resultados mostram que os agregados micelares no complexo não são afetados por efeitos de força iônica em concentrações de SDS até na saturação e a proteína, nos domínios onde ocorre a associação, tem a habilidade de controlar o tamanho deles.

ABREVIATURAS

BSA	Albumina do Soro Bovino
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
HSA	Albumina do Soro Humano
W	Triptofano
<i>cmc</i>	Concentração Micelar Crítica
<i>cac</i>	Concentração Crítica de Agregação
<i>psp</i>	Ponto de saturação
γ	Tensão Superficial
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixos ângulos
SANS	Espalhamento de nêutrons a baixos ângulos
PEO	Pólioxydo-etileno
α	Grau de ionização
MA	9-metilantraceno
[]	Concentração em mol/L
λ	Condutância equivalente
λ_{na}	Condutância equivalente do sódio
λ_{sd}	Condutância equivalente do dodecilsulfato
J_{obs}	Intensidade de espalhamento
q	Ângulo de espalhamento
n	número de agregação
R_g	raio de giro
$\text{Ru}(\text{bipy})_2^{2+}$	rutênio bispíridíneo

CAPÍTULO I

Introdução

1. Surfactantes

O termo surfactante refere-se a uma classe de compostos químicos tecnicamente conhecida como anfífilicos (da palavra grega *amphi* que significa ambos), em cuja estrutura molecular existem duas regiões distintas, uma hidrofílica (polar) que tem afinidade com moléculas de água e uma outra parte hidrofóbica (apolar), que tem afinidade com moléculas de gordura [1,2], por exemplo.

Os surfactantes são classificados conforme a natureza do grupo hidrofílico em:

- a) Catiônicos: possuem a parte hidrofílica da molécula constituída por um átomo ou grupo carregado positivamente.
- b) Aniônicos: apresentam na parte hidrofílica da molécula um átomo ou grupo carregado negativamente.
- c) Zwitteriônicos: possuem grupamentos com características ácida ou básica e passam a ter o comportamento aniônico ou catiônico dependendo do pH do meio no qual se encontram.
- d) Não-iônicos: apresentam na estrutura molecular uma estrutura polar que interage fortemente com a água, principalmente por pontes de hidrogênio.

Os surfactantes apresentam os seguintes comportamentos característicos: (i) quando em solução, diminuem a tensão interfacial e superficial, devido a adsorção e orientação na interface; (ii) moderada concentração máxima de moléculas dispersas em solução; (iii) formação de micelas acima de uma determinada concentração (*cmc*) devido ao decréscimo

de energia livre do sistema; (iv) solubilização de substâncias insolúveis em água pelas micelas [4]. Alguns exemplos de surfactantes apresentados quanto a sua classe podem ser vistos na Tabela 01.

Tabela 01- Alguns exemplos de surfactantes quanto a classificação:

Surfactantes	Fórmula	Classificação
Brometo de dodeciltri-Metilamônio(DoTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$	Catiônico
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^-\text{Na}^+$	Aniônico
Propionato de N-alkuil- N,N-dimetil- β -amônio	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	Zwitteriônico
N-alkuilfenol-m-polioxietileno	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{H}$	Não-iônicos

1.1.Micelas

As moléculas de surfactantes podem associar-se formando uma variedade de possíveis micro-estruturas que dependem da estrutura molecular, da concentração e da composição do sistema [3]. Em uma concentração mais elevada de surfactante, começa a surgir em solução agregados estruturalmente organizados chamados micelas [2,3,4]. Este fenômeno deve-se à ação do efeito hidrofóbico, isto é, a alta organização das moléculas de água, que promovem naturalmente a associação das caldas hidrofóbicas dos monômeros, resultando na formação de agregados. Esta agregação é um processo espontâneo e altamente cooperativo [5]. Micelas são agregados coloidais formados por moléculas de surfactantes em equilíbrio com seus monômeros (Figura 01). Esses monômeros rearranjam-se espontaneamente de forma a adquirirem uma conformação termodinâmica estável [4].

Uma das mais importantes consequências da micelização, do ponto de vista farmacêutico, é que as micelas são capazes de solubilizar fármacos com os mais variados tipos de solubilidade [20,37].

O número de moléculas de surfactante (monômeros) agregados na formação da micela é chamado de *número de agregação (n)*. O número de agregação varia de acordo

com o comprimento da cadeia hidrofóbica, da estrutura, e da carga do grupo hidrofílico do surfactante, do tipo e da concentração do contra-íon e de aditivos orgânicos.

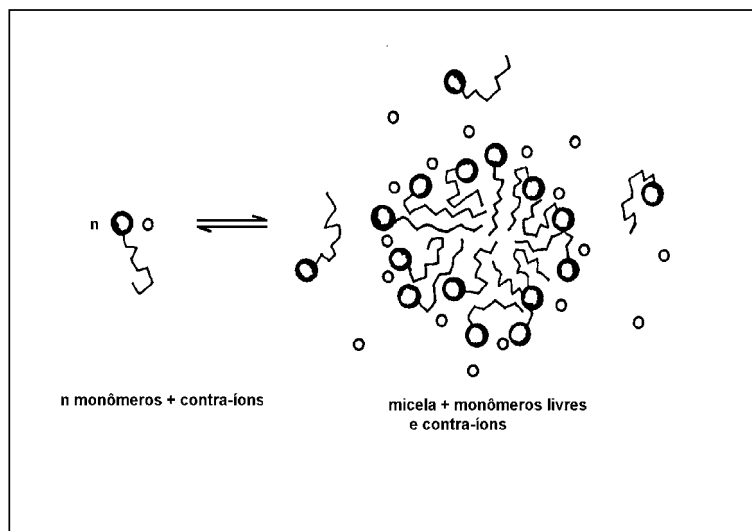


Figura 01: Formação de micelas em solução[3]

O início do agregado é definido através da brusca variação da propriedade analisada, quando se varia a concentração de surfactante [4,6]. Esta concentração é denominada *concentração micelar crítica (cmc)*. A *cmc* pode ser definida, portanto, como a menor concentração de surfactante na qual as micelas se formam. Os valores da *cmc* dependem da hidrofobicidade da cadeia hidrocarbônica, da carga do surfactante, da natureza da cabeça polar e do contra-íon, do tipo de concentração do eletrólito adicionado. A *cmc* depende ainda da temperatura, pressão de vapor da água e da concentração de aditivos iônicos e orgânicos [5,8]. Cada surfactante é, portanto, caracterizado por uma *cmc* em condições experimentais definidas. É importante salientar que a mudança da propriedade física analisada ocorre numa faixa de concentração de surfactante e, portanto, a *cmc* é definida neste intervalo.

A Figura 02 mostra a representação geral para uma micela iônica, quando em solução aquosa diluída, segundo o modelo de Gruen [7]. A estrutura é aproximadamente esférica, com grupos iônicos na superfície e os contra-íons em torno da micela, neutralizando parcialmente a carga na superfície da micela [5]. A camada de Stern, vem imediatamente ao redor do núcleo, com propriedades intermediárias entre a água e os hidrocarbonetos [5].

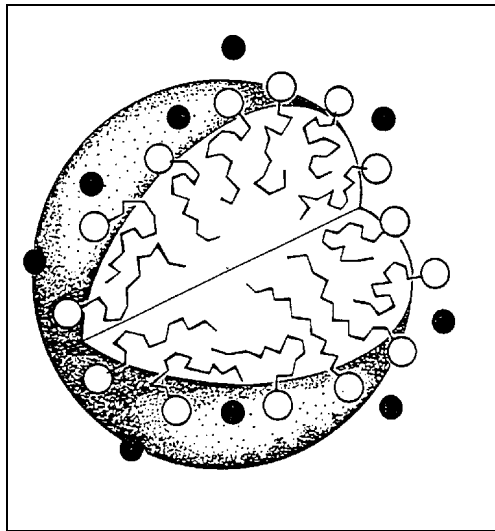


Figura 02: Corte de uma micela esférica, segundo modelo proposto por Gruen [7].

A secção mostra no núcleo as caudas flexíveis do surfactante;

A camada de Stern contém os grupos hidrofílicos (O) e os contra-íons (●).

2. Proteínas _ Albumina do Soro Bovino (BSA)

Proteínas são biomoléculas de alto peso molecular existente em todos os organismos vivos. São classificadas de acordo com sua composição, em dois grandes grupos; as **proteínas simples**, como a albumina, que quando hidrolisadas geram apenas os aminoácidos, e as **proteínas conjugadas**, que quando hidrolisadas geram os aminoácidos junto com outros compostos como carboidratos e gorduras.

As proteínas podem ser classificadas também como **fibrosas** as quais são formadas por cadeias de polipeptídios organizados lado a lado em longos filamentos e as **globulares**, que têm estrutura compacta e quase esférica [37].

A soroalbumina é a maior proteína globular existente no plasma (peso molecular de ≈ 66 kDaltons). Sua concentração média é de 5 g/100 mL, e contribui com 80% da pressão sanguínea osmótica do sistema circulatório, sendo também responsável pelo tamponamento do pH do sangue [27,37]. Em especial, as albuminas formam complexos com ácidos graxos

sendo responsáveis pela remoção destas substâncias livres na corrente sanguínea. As forças que determinam a estrutura das proteínas globulares são as mesmas que atuam sobre todas as moléculas. Entre as forças que estabilizam a estrutura das proteínas, as interações hidrofóbicas, que repelem água das cadeias laterais hidrocarbônicas dos aminoácidos neutros, são particularmente importante. A formação de pontes dissulfeto, de ligações de hidrogênio entre grupos polares dos aminoácidos e as atrações iônicas, chamadas pontes salinas, entre sítios positivos e negativos das várias cadeias laterais de aminoácidos do interior da proteína também são relevantes [37].

Tabela 02: Propriedades físico-químicas da Albumina [27,37]

Ponto isoeletrico	4,7
Dimensão global, Å	$41,6 \times 140,9$
Peso molecular (g/mol)	66.000
Viscosidade, η	0,041
Quantidade no plasma (mg/100 _{MI})	3500-4500

A BSA concentrada é usada no tratamento traumático e em choques hemorrágicos, em queimaduras muito extensas e em casos de perda contínua de proteínas, visto que a albumina é veículo de transporte de moléculas pouco solúveis no organismo. Na indústria farmacêutica, é aceito que toda distribuição, metabolismo e eficiência de muitas drogas podem ser alteradas baseados na afinidade com a soro albumina [20,37]. Algumas propriedades físico-químicas da albumina são listadas na Tabela 02.

A estrutura primária da BSA é constituída de uma única cadeia com 581 resíduos de aminoácidos. Cerca de 67% da estrutura secundária é formada por α -hélice. Estruturalmente, a BSA é muito semelhante à albumina do soro humano, HSA [10]. Ela mantém cerca de 76% da identidade sequencial da HSA e, sob o ponto de vista espectroscópico, difere apenas por ter dois resíduos de triptofano (W^{131} e W^{214}), enquanto que a HSA possui apenas W^{214} . A HSA tem a habilidade de unir ligantes hidrofóbicos assim como a BSA. Recentemente, foi obtida a estrutura cristalográfica para o complexo HSA-ácido mirístico, revelando que um total de cinco moléculas de ácido mirístico ligam-se assimetricamente a proteína. Há fortes evidências espectroscópicas de que o mecanismo de ligação do SDS e do ácido mirístico à cadeia protéica são muito similares [10].

O conhecimento do comportamento das proteínas em meios não convencionais pode ser de grande interesse no entendimento de processos de enovelamento e desenovelamento das proteínas. A Figura 03 é uma representação cristalográfica determinada por raio-X da Albumina do Soro Humano. Não se tem ainda a estrutura cristalográfica da BSA catalogada.

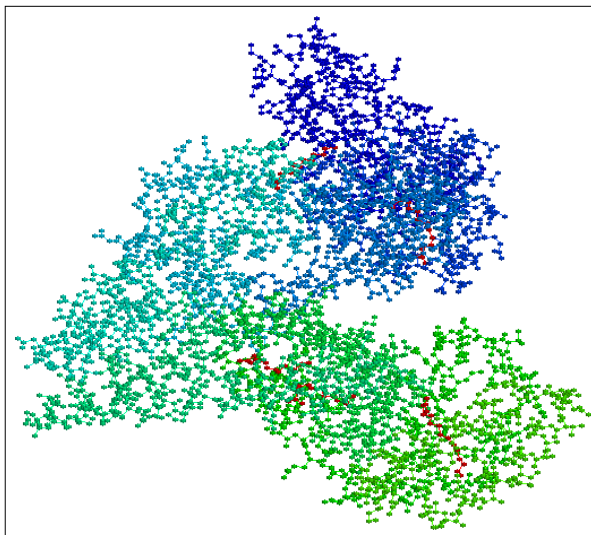


Figura 03: Estrutura cristalográfica da HSA [38]

2.1. Interações proteína-surfactante

Misturas entre proteínas e surfactantes tem sido extensivamente estudadas nas últimas décadas devido às suas múltiplas aplicações em biociências, nas indústrias de alimentos e cosméticos e em biotecnologia. Na indústria de alimentos, emulsões utilizadas em produtos comestíveis como molhos de salada ou sorvetes, contém proteínas e emulsificantes na interface água/óleo e os surfactantes são importantes na estabilização para evitar coalescência e nas mudanças reológicas [20,27,37]. Já nas áreas de detergentes e cosmética, surfactantes podem ser agressivos e produzir aspereza, inchaço e vermelhidão quando em contato com a pele. Alguns podem promover a perda de permeabilidade e hidratação da pele e também favorecer a penetração de outros materiais aumentando a irritabilidade. Imokauwa e col [28] sugeriram que a interação de surfactantes com BSA reflete, em parte,

a interação de surfactantes com a pele. Eles estudaram estágios da aspereza da pele “*in vivo*” causada pela formação de complexos proteína-surfactante. Além disso sabe-se que SDS reduz a capacidade do tecido de reter grandes quantidades de água [27]. Se surfactantes influenciam a hidratação de proteínas da pele, alguns sistemas modelo, tais como BSA-SDS, podem ser usados para avaliar as interações de surfactantes com a pele.

Em concentrações constantes de proteína, a tendência de formação do complexo proteína/surfactante aumenta com o aumento da concentração de surfactante. A Figura 04 mostra uma isoterma de adsorção entre moléculas de surfactante e proteína. A isoterma exhibe três regiões distintas, que podem ser definidas pela seguinte sequência [11,20,27]:

- (a) Uma região em baixas concentrações de surfactante onde ocorre ligação específica dos monômeros com sítios da proteína de alta afinidade resultante de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Esta região é muitas vezes seguida por um platô que define a passagem para a região (b). A ligação de monômeros nos sítios de alta afinidade não causa mudanças conformacionais da proteína;
- (b) Uma segunda região onde ocorre a ligação de um número grande de monômeros induzindo expansão da macromolécula, neste caso, tem-se ligação não específica.
- (c) À medida que se aumenta a concentração de surfactante, observa-se um aumento da ligação por causa das intensas ligações dos outros sítios ativos que são imediatamente preenchidos. O desdobramento estrutural da proteína ocorre nesta região, ou seja, é nesta região que a proteína perde a estrutura terciária;
- (d) Finalmente, uma região de saturação é alcançada pelo excesso de surfactante adicionado. Provavelmente, deve acontecer um alongamento na cadeia macromolecular com um conseqüente aumento da viscosidade do complexo.

A discussão sobre o processo de ligação e de saturação de proteínas por surfactantes, têm levado autores a optar por diferentes conclusões e discrepâncias. Um ponto relevante é quais os fatores que determinam a associação e as características das isotermas de adsorção [21]. Outro aspecto relevante é como a conformação das proteínas é afetada pela associação proteína-surfactante, e quando esta interação pode causar mudanças na função da proteína, quando no caso de enzimas, proteínas transportadoras ou toxinas.

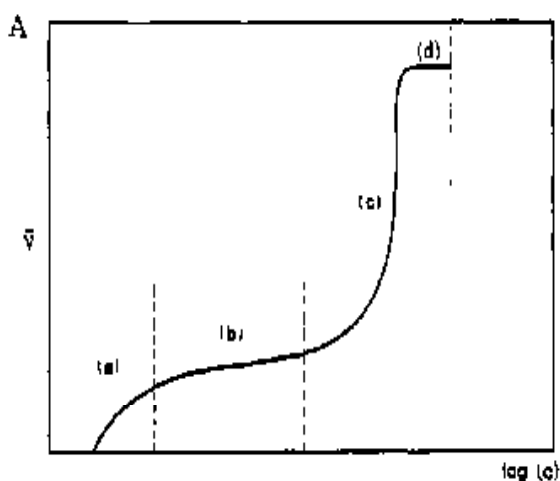


Figura 04: Representação esquemática da interação proteína-surfactante, onde \bar{v} é o número de surfactante ligado por molécula de proteína como função do logaritmo da concentração do surfactante livre. A região (a) representa as ligações específicas; a região (b) ligações não cooperativas; a região (c) as ligações cooperativas e a região (d) a saturação da proteína [34]

Diferentes modelos estruturais para o complexo BSA-SDS têm sido atribuídos. A Figura 05 mostra diferentes formas sugeridas para o complexo. Reynolds e Tanford [35] após uma série de estudos de viscosidade intrínseca, propuseram o modelo tipo bastão (Figura 5b) como a conformação mais provável para o complexo. Lundahl e colaboradores [25], propuseram outra alternativa: um modelo semelhante a uma hélice, onde as micelas de SDS ficariam centralizadas com a cadeia polipeptídica localizando-se ao redor das micelas (Figura 5c). Teixeira e colaboradores [13], utilizando espalhamento de nêutrons a baixos ângulos, propuseram, para complexos BSA-SDS, um modelo tipo “colar de pérolas” (Figura 05a). No entanto, a estrutura mais consistente e aceita, é aquela formada por agregados micelares estatisticamente arranjados ao longo da cadeia peptídica estendida (desnaturada), denominada de “colar de pérola” (Figura 5d) [20].

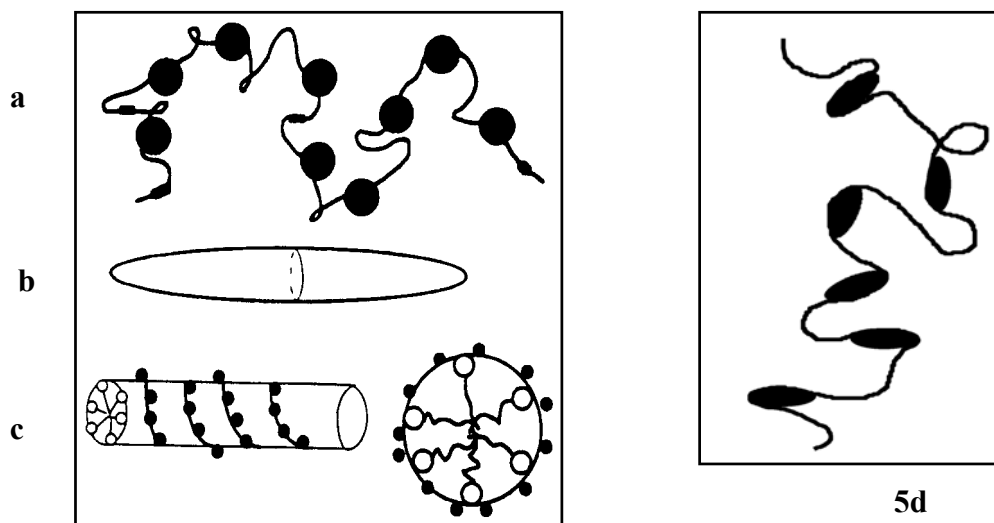


Figura 05: Modelos discutidos para o complexo Proteína-Surfactante

(b- Modelo de colar de pérolas; b- Modelo tipo bastão;

c- Modelo de hélice flexível; 6 d- Modelo colar de pérolas elipsoidais) [11]

Durchschlag e colaboradores [32], usaram espectroscopia para monitorar a mudança de estrutura da proteína induzida por surfactante. Eles observaram que em baixas concentrações de surfactante, a estrutura da proteína é ligeiramente afetada. Em altas concentrações, no entanto, observaram uma mudança significativa na intensidade de fluorescência acompanhada de deslocamento da banda de emissão de fluorescência indicando mudanças conformacionais.

A Figura 06 é uma representação, sugerida por Turro e Lei [11], onde se pode observar a proteína no estado natural (Fig. 06a) e, em seguida, os monômeros de surfactante que começam a ligar-se na cadeia protéica (Fig. 06b). A ligação continua até formar agregados tipicamente micelares causando a abertura da cadeia da proteína (Fig. 06c), até o ponto onde a cadeia protéica encontra-se saturado pelos monômeros (Fig. 06d).

Tamanho e características físico-químicas dos agregados que se associam à cadeia da proteína dependem, fortemente, da concentração do surfactante e das condições experimentais. Assim, a concentração de saturação da proteína por moléculas de surfactante, parâmetro relevante em sistemas proteína-surfactante, necessariamente é dependente das condições experimentais.

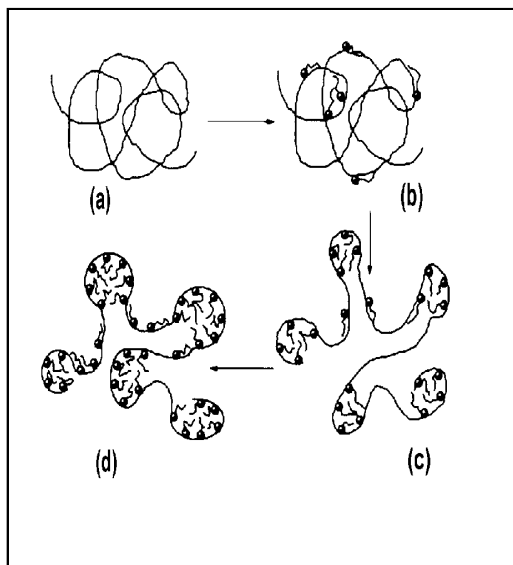


Figura 06: Ilustração do processo de associação dos agregados micelares segundo Turro e Lei [11]

Muitas metodologias e técnicas têm sido usadas com o propósito de fornecer e interpretar as propriedades dos complexos proteína-surfactantes. Recentemente, usando técnicas espectroscópicas, Turro e Lei [11] discutiram todas as possíveis estruturas apresentadas na Figura 06 e concluíram que o surfactante induzia a abertura da proteína globular de tal forma que a BSA associava-se aos agregados micelares, preferencialmente, ligando-se na interface. A estrutura do complexo apresentada seria concordante ao já proposto modelo “*colar de pérolas*”.[11] Concordam também com este modelo, os resultados obtidos por viscosidade em diferentes concentrações de tampão apresentados por Shinagawa e col. [23]. Este fato é importante na caracterização da estrutura do complexo, especialmente com o modo de interação entre o SDS e o polipeptídeo.

No entanto, um relevante tema de discussão é referente à concentração de surfactante necessária para saturar a cadeia protéica. Este parâmetro já havia sido determinado por Reynolds e Tanford [12] usando diálise que é uma medida direta da concentração de surfactante necessário para saturar as cadeias protéicas. Os autores encontraram, para diferentes tipos de proteínas, uma relação ≈ 1.4 g de SDS/g de proteína (ou ≈ 49 mM de SDS/g proteína.). Em particular, em força iônica de 0,005 M, portanto baixa, eles encontraram 1,35 g SDS/g BSA (equivalentes a 47 mM de SDS).

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos por Reynolds e Tanford [12] para as diferentes proteínas, relacionando a saturação com a força iônica do meio, o pH e o peso molecular das macromoléculas.

Tabela 3: Sistemas formados por SDS e diferentes proteínas

Proteína	Força iônica	g SDS/g Proteína	pH	P. M.
Lisozina	0,26	1,39	7,2	14.400
Ovalbumina (OVA)	0,26	1,46	7,2	43.000
BSA	0,005 0,52	1,35 0,36	(0,047 M) 6,7	69.000
Miosina	0,26	1,41	7,2	220.000
Hemoglobina	0,13 0,32	1,40 0,46	6,8	16,600

Enfatizamos que, ao longo dos tempos, este parâmetro de saturação tem sido comentado e referenciado, mas com restrições. Alguns comentários:

- Em conclusões sobre resultados de espalhamento de nêutrons por pequenos ângulos (SANS), Guo et al. [13] concluíram que a saturação, supostamente ocorrente em 1,4g SDS/g proteína [12], não era observada como uma transição nítida nas curvas de intensidade de espalhamento. Neste caso, os autores trabalharam em condições experimentais de alta força iônica 0,2 e 0,6 M.
- Estudando o sistema BSA/SDS por viscosidade, Shinagawa et al. [23] duramente concluíram que “os resultados indicam claramente que a crença da quantidade fixa de 1,4 g de SDS por grama de proteína, é errada e enganadora”. Os autores estudaram concentrações de tampão até 220 mM.
- Turro e Lei [11] concluíram que não estava claro onde exatamente micelas livres de SDS formariam-se em equilíbrio com o complexo BSA-SDS. Referiam-se à saturação, mas sem evidências da formação de micelas livres acima da concentração de SDS de saturação quando em 1 % de BSA.

Recentemente, por medidas de SAXS e associando a resultados de tensão superficial e condutividade elétrica, Santos e colaboradores [20], com o propósito de esclarecer o significado do ponto de saturação, apresentaram uma interpretação sobre o clássico ponto de saturação da BSA por SDS, aquele de 1,34 g SDS/g BSA (≈ 47 mM SDS) determinada por diálise [12], como sendo o resultado de um processo de ligação cooperativa de SDS acompanhado de crescimento dos agregados micelares ligados à proteína.

2.2 Efeito salino

A adição de sais inorgânicos a surfactantes iônicos tem sido muito estudada por diversos autores ao longo dos anos [4,8,18,23]. Já é documentado na literatura que a adição de sal a surfactantes aniônicos diminui a *cmc* consideravelmente. [8,18,23] O efeito salino diminui o potencial de superfície e diminui a repulsão eletrostática das cabeças de surfactantes iônicos, diminuindo assim a *cmc* [18]. Normalmente este fato é acompanhado de crescimento dos agregados micelares.

Comportamento semelhante é encontrado para soluções com polímeros neutros e surfactantes aniônicos [18,20]. O efeito salino sobre o complexo polímero-surfactante geralmente diminui a *cac* e aumenta o ponto de saturação do polímero. Esta diminuição da *cac* indica que a associação entre o polímero e o surfactante está começando em concentrações menores de surfactantes. A interpretação para o efeito salino sobre complexos polímero-surfactante está fundamentada no fato que o aumento da força iônica suprime as cargas e reduz o potencial superficial, e/ou devido à compressão da dupla camada elétrica resultando em diminuição da *cac*, tornando os agregados termodinamicamente mais estáveis [20].

Zanette e colaboradores [18], por condutividade elétrica, mostraram que, variando a concentração de NaCl, a variação do *psp* com a concentração de sal no sistema SDS/PEO, depende da concentração do polímero. Curiosamente, os gráficos obtidos em função da concentração do sal, tanto para *cmc* como para a *cac*, eram lineares, cujas diferenças nas inclinações estavam na ordem de 20% apenas. As características dos gráficos são tipicamente de agregados micelares iônicos, mas as diferentes inclinações estão diretamente relacionadas com diferenças em propriedades das interfaces dos agregados, como grau de

ionização. De acordo com os autores, em baixas concentrações de polímero, o ponto de saturação do polímero diminui com a concentração de sal, sendo que numa concentração intermediária, a saturação do polímero permanece constante e, finalmente, aumenta para altas concentrações de polímero. A interpretação dos autores para o efeito salino sobre os valores de condutividade elétrica é de que, a baixas concentrações de PEO, o “suposto” ponto de saturação do polímero, *psp* não representa exatamente a saturação do polímero por surfactantes.

3. Definições das técnicas

3.1. Tensão superficial

As moléculas na superfície de um líquido estão sujeitas as fortes forças de atração das moléculas interiores. A resultante dessas forças, cuja direção é a mesma do plano tangente à superfície (em qualquer ponto desta), atua de maneira que a superfície seja a menor possível. A grandeza desta força, atuando perpendicularmente (por unidade de comprimento) ao plano na superfície é dita de *tensão superficial* (γ). Por causa desta resultante, as moléculas superficiais tendem a penetrar no interior do líquido e, em consequência, a superfície tende a contrair-se espontaneamente para adquirir área mínima possível. Essa é a razão pela qual pequenas gotas de líquido ou bolhas de gás tendem a forma esférica. Gotas maiores sofrem deformação por causa da força gravitacional. A tensão superficial é equivalente à energia livre interfacial por unidade de área do limite entre a solução e o ar [6].

A Figura 07 mostra um perfil de tensão superficial versus a concentração de um surfactante puro. À medida que se aumenta a concentração do surfactante, monômeros de surfactante começam a orientar as cadeias hidrocarbônicas para um meio não aquoso numa interface aquosa e esta orientação promove adsorção na interface conduzindo a redução de tensão interfacial que é interrompida, bruscamente, na *cmc*. A constância da tensão superficial, portanto descrita no gráfico pelo platô, indica que todo adicional surfactante à

solução localiza-se no interior da solução formando micelas enquanto que, na superfície, a concentração monomérica permanece constante.

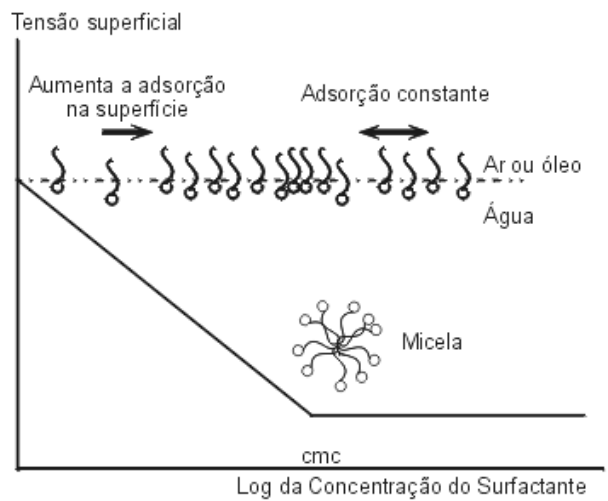


Figura 07: Mostra um gráfico de tensão superficial versus concentração do surfactante e o momento em que se tem a cmc do surfactante puro⁷

3.2. Medidas de condutividade de complexos BSA-SDS

O perfil de condutividade elétrica em função da concentração de surfactante é um importante e usual método para determinar a *cmc* [6].

Esta técnica baseia-se na medida da resistência elétrica de soluções, já que surfactantes quando em soluções diluídas comportam-se como eletrólitos fortes. Portanto, através do clássico perfil de condutividade *versus* concentração de surfactante, pode-se determinar o valor de *cmc* e o grau de ionização.

A medida de condutividade de solução de surfactantes contendo BSA também mostra os dois pontos de inflexão *cac* e *psp*, conforme medidos por tensão superficial, e três regiões lineares: (i) abaixo da *cac*, (ii) acima do *psp* e (iii) entre *cac-psp*⁹. A Figura 08 ilustra um clássico perfil de uma curva de condutividade elétrica versus concentração de surfactante em presença de polímero, e as três regiões podem ser facilmente observadas.

A região acima do *psp* depende da concentração de proteína e de sal. Acima deste tem-se a formação de micelas aquosas que estão em equilíbrio com os complexos formados.

A região entre a *cac* e o *psp* é definida pela existência de agregados em solução.

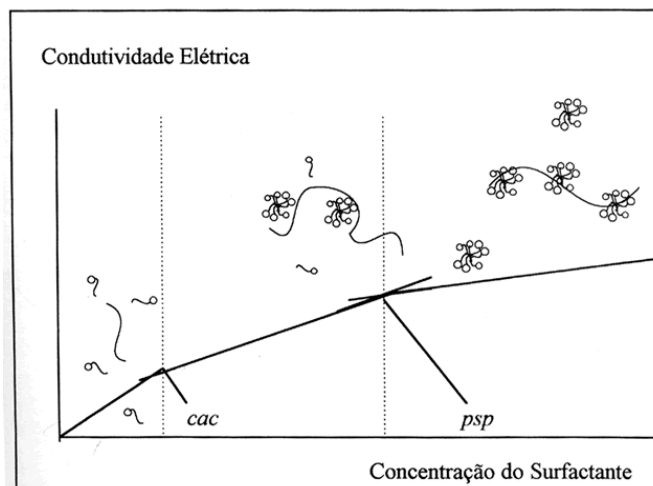


Figura 08: Mostra um gráfico de condutividade elétrica versus concentração do surfactante na presença de polímero⁷

3.3. Medidas de fluorescência

Luminescência é a emissão de fótons por elétrons eletronicamente excitados. Durante o processo de absorção de radiação eletromagnética no ultravioleta ou visível, as moléculas são elevadas a um estado eletronicamente excitado. Muitas moléculas dissipam este excesso de energia na forma de calor pela colisão com outras moléculas e depois emitem energia como luz em um comprimento de onda diferente daquele correspondente à radiação absorvida [26]. Luminescência é dividida em dois tipos, *fosforescência* e *fluorescência*, que dependem da natureza do grupo e do estado excitado.

Em *Fluorescência* o tempo no qual o elétron do fluoróforo permanece no estado excitado é de até 10^{-8} segundos, já em *Fosforescência* o esse tempo é da ordem de μ segundos a segundos [26]. A técnica de fluorescência tem sido utilizada nas áreas da química, bioquímica e medicina, trazendo numerosas contribuições em análise de proteínas, membranas, ácidos nucleicos e complexos macromoleculares.

A Figura 09 mostra um diagrama de energia, universalmente utilizado para representar os principais caminhos que elétrons excitados de uma molécula percorrem. Se nenhum processo perturba a molécula, cessada a excitação, a molécula deveria retornar ao estado fundamental com emissão de fóton de mesma energia do processo de absorção, cujo tempo está na ordem de 10^{-10} a 10^{-7} segundos. Em algumas moléculas, no entanto, os estados fundamental e excitado estão associados à múltiplos níveis vibracionais (Figura 07) e, sempre que a molécula absorve energia a emissão ocorre em largas bandas. Na prática, após a absorção, as bandas estão relacionadas com diferentes processos como dissociação e aparecimento de radicais, reações fotoquímicas e transições sem radiação como casos processos de conversão interna, isto é, a energia eletrônica é convertida em vibracional dentro da mesma molécula. Em alguns casos, ocorre atravessamento de sistema, singlete para tripleto, acompanhado de tempo de vida longo, na ordem de segundos.

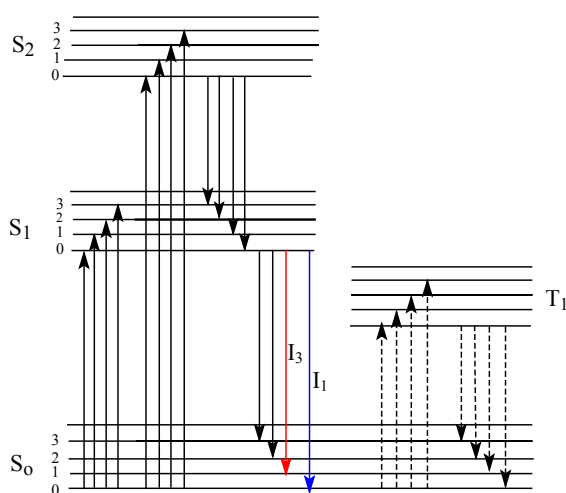


Figura 09: Diagrama de energia

Conforme diagrama da Figura 09, na temperatura ambiente, quase a totalidade das moléculas encontra-se em E_0 no nível vibracional v_0 . Na absorção, elas podem passar para diferentes níveis vibracionais de E_1 , em seguida a molécula chega num equilíbrio térmico no v_0 do nível eletrônico E_1 , e, finalmente, ocorre emissão em frequências menores do que na absorção. Fluorescência e fosforescência correspondem à emissão de luz associadas com as transições de $S_1^{v=0}$ e $T_1^{v=0}$ para $S_0^{v=0}$, respectivamente.

Geralmente as moléculas que apresentam fluorescência possuem elétrons desemparelhados nas duplas conjugadas. Este processo inicia-se pela excitação eletrônica de uma molécula no seu estado fundamental pela absorção de radiação eletromagnética. Neste caso, o caminho de volta ao estado fundamental envolve a emissão de radiação do estado singlete sendo o grupo molecular emissor de radiação chamado por *fluoróforo* [30]. As proteínas apresentam três diferentes resíduos de aminoácidos que contribuem em emissões de fluorescência: tirosina, triptofano e fenilalanina. Cerca de 90% da emissão total de fluorescência das proteínas, no entanto, é de atribuição aos resíduos de triptofano (Figura 10). O tempo de fluorescência dos resíduos de triptofano nas proteínas é de 1 a 6 nseg, dependendo da estrutura do polipeptídeo. A banda de emissão máxima do triptofano, e seus derivados, são muito sensíveis à polaridade do solvente, devido às interações específicas entre o solvente e o anel. Exemplo deste efeito é observado no espectro de emissão do triptofano em água, que ocorre em 348 nm, enquanto que o resíduo de triptofano da albumina humana, HSA, emite em 342 nm [26].

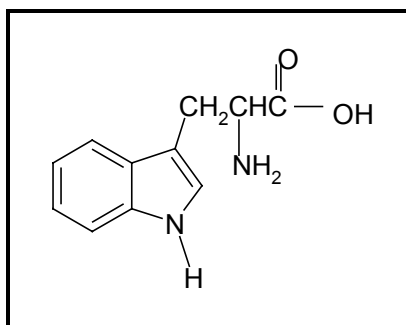


Figura 10: Estrutura do triptofano

Espectroscopia de fluorescência é um método bastante utilizado para estudar proteínas e os complexos formados. O espectro de emissão das proteínas é sensível à ligação com substratos, reação de associação e modificação da estrutura nativa e desnaturação [26]. Medidas de fluorescência foram usadas para estudar as mudanças estruturais e conformacionais da proteína, monitorando os resíduos de triptofano existentes na cadeia protéica. Informações sobre a natureza dos agregados entre proteína-surfactante podem ser obtidas através dos estudos de fluorescência dos resíduos de triptofano existentes

na proteína. O espectro de emissão observado para a BSA, representa a contribuição das emissões dos triptofanos em seus respectivos microambientes na estrutura da proteína.

A supressão da fluorescência por agentes como os surfactantes aniônicos, ocorre via contato físico da molécula supressora com o fluoróforo e tem dependência direta com a aproximação destas moléculas com o fluoróforo ligado à proteína [10]. Assim, fluorescência estacionária pode ser usada como uma técnica para acompanhar a abertura da cadeia peptídica e justificar a associação do surfactante a domínios hidrofóbicos da estrutura da proteína.

3.4. Medidas de Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos

Quando um feixe de luz atinge uma solução ou dispersão coloidal, parte da luz poderá ser absorvida, parte sofre espalhamento e o restante é transmitido através da solução sem outras perturbações. A intensidade, polarização e distribuição angular da luz espalhada por uma dispersão coloidal, dependem do tamanho e da forma das partículas, das interações entre as partículas e da diferença entre os índices de refração das partículas e do meio [2]. As medidas de espalhamento de luz, portanto, são de grande importância na determinação de tamanho, forma e interações de partículas, e uma de suas mais importantes aplicações é encontrada no estudo de substâncias macromoleculares em solução. As técnicas de espalhamento de luz, raio-X e nêutrons são, certamente, muito apropriadas para estudar a estrutura de tais sistemas. No caso de luz e raio-X, a interação ocorre entre o campo elétrico da radiação incidente e as cargas eletrônicas do material investigado: a principal diferença entre estas duas técnicas é o comprimento de onda, tipicamente da ordem de 1 Å para raio-X e em torno de 5.000 Å para a luz visível. Já o feixe de nêutrons interage quase que exclusivamente com o núcleo dos átomos, uma vez que os nêutrons não possuem carga elétrica, seu comprimento de onda normalmente varia de 4 a 20 Å [36].

A Luz Síncrotron é uma luz de altíssima intensidade que abrange as faixas do infravermelho a dos raios-X, incluindo, as faixas da luz visível e a do ultravioleta. Raios-X é produzido quando elétrons, que viajam num anel próximos à velocidade da luz, são desacelerados (isso acontece quando eles são defletados pelos ímãs dipolares). Os raios-X

que são ejetados da máquina de síncrotron são extremamente poderosos: em apenas 20 milissegundos seriam capazes de perfurar uma chapa de aço de 10 cm de espessura.

A intensidade de espalhamento, $I(q)$, de um sistema isotrópico de partículas esféricas, ou esferóides de baixa anisometria (razão entre os eixos maior e menor da elipsóide) num meio é descrita por [27]:

$$I(q) = n_p P(q) \cdot S(q) \quad (01)$$

onde n_p é a densidade numérica de partículas (número de partículas, n , por volume, V) e $P(q)$ é o fator de forma da partícula e $S(q)$ é a função de interferência entre partículas; q é o vetor de espalhamento de módulo $4\pi/\lambda \sin\theta$ (λ é o comprimento de onda da radiação e 2θ é o ângulo de espalhamento).

Neste contexto, pode ser mostrado que a intensidade de espalhamento $I(q)$ está relacionada com a função de distância $p(r)$ da partícula, tal como apresentado na Figura 10. A função $p(r)$ carrega a informação sobre a forma do objeto espalhador (ver exemplos na Figura 10) e da dimensão máxima, $D_{\text{máx}}$, da mesma, uma vez que $p(r) = 0$ para $r = 0$ e $r = D_{\text{máx}}$. A função $p(r)$ pode ser obtida pela equação 03:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty I(q)(qr) \sin(qr) dq \quad (02)$$

Para a determinação da $p(r)$, neste trabalho foi utilizado um programa computacional chamado GNOM, desenvolvido por D.I. Svergun e colaboradores [27].

A Figura 11 mostra alguns exemplos ilustrativos. No caso de esferas, $p(r)$ tem um máximo em torno de $D_{\text{max}}/2$. D_{max} corresponde à dimensão máxima do objeto espalhador de tal forma que $p(r)$ vai a zero para $r \geq D_{\text{max}}$. Para objetos anisométricos, $p(r)$ decai linearmente com a distância entre o tamanho da seção transversal do objeto e sua dimensão máxima. Para objetos de seção transversal constante e de forma arbitrária, o ponto de inflexão r_I entre o máximo e a região de decaimento fornece uma estimativa do tamanho da seção transversal [36].

A partir da função $p(r)$ pode-se estimar a dimensão máxima da partícula e sua forma. Além disso, o raio de giro eletrônico, R_g , do objeto espalhador pode ser obtido através da relação [20,27]:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{\max}} p(r) r^2 dr}{2 \int_0^{D_{\max}} p(r) dr} \quad (03)$$

Na Figura 11 pode ser observado que a curva perfeitamente simétrica se correlaciona com uma esfera; já a curva de distribuição não-simétrica e alongada corresponde à um a forma elipsóide prolata, conforme representado no esquema. Quanto mais anisométrico for o objeto espalhador, mais alongada é a função $p(r)$.

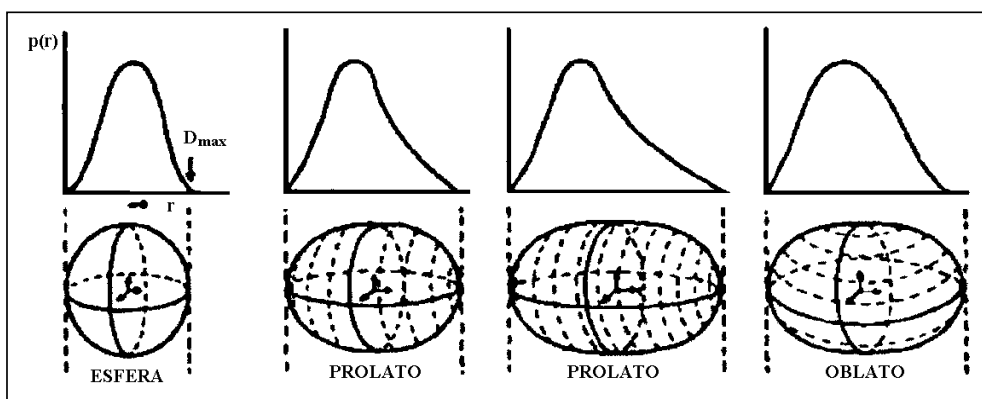


Figura 11: Função distribuição de distâncias $p(r)$ para partículas com distribuição de densidade eletrônica homogênea [27].

Neste trabalho foi utilizado um programa de computador chamado CRY SOL desenvolvido por Svergun e colaboradores [27], que calcula o espalhamento de macromoléculas a partir da estrutura cristalográfica conhecida. A partir das coordenadas atômicas (provenientes do banco de dados da proteína – PDB), o programa gera a correspondente curva de espalhamento da proteína em solução que pode ser comparada à curva experimental de SAXS.

Objetivos

A proposta principal deste trabalho é a de monitorar e interpretar a variação dos parâmetros *cac* e *psp*, utilizando as técnicas de condutividade elétrica e de tensão superficial em função da concentração de SDS, causada por mudanças da força iônica do meio, variando a concentração de tampão acetato em pH 5,40. As medidas do ponto de saturação da proteína, monitoradas por tensão superficial, através da variação da força iônica da misturas, faz parte de uma discussão para interpretar as diversas observações referentes ao significado quantitativo e estrutural do ponto de saturação da proteína. Desta forma, pretende-se interpretar e unificar as diferentes opiniões e conclusões relacionadas no item 2.1. da introdução.

Para identificar a influência da mudança de força iônica do meio sobre os agregados micelares ligados ao complexo BSA-SDS, será usada a técnica de fluorescência estacionária para medir o tamanho médio dos agregados. Na hipótese de que os agregados na saturação cresçam por efeito de blindagem do potencial de superfície pelo aumento da força iônica, necessariamente deve-se identificar também crescimento dos agregados micelares no complexo. A vantagem de utilizar estas medidas clássicas reside no fato de que elas já foram largamente utilizadas para sistemas compostos de misturas de polímeros neutros e surfactantes aniônicos e as características dos gráficos, bem como suas interpretações, serão usadas neste trabalho como suporte para a interpretação dos resultados.

Com o objetivo de estender o projeto, SAXS foi usado para monitorar a influência da força iônica sobre o fenômeno de complexação no ponto de saturação da associação entre a BSA e SDS. Assim com o principal objetivo de elucidar e investigar como a conformação da proteína muda sob influência de razões crescentes da concentração de sal, foi realizado um estudo sistemático por SAXS, na ausência e em presença de concentrações crescentes de tampão acetato de sódio, de 20 a 500 mM, em diversas concentrações de SDS. Esta última técnica é parte de um projeto do CNPq, coordenado pelo Prof. Dino Zanette em colaboração com Prof^a. Rosângela Itri do Departamento de Física Aplicada da Universidade de São Paulo.

CAPÍTULO II

Parte Experimental

1. Materiais

1.1. Reagentes

A Albumina do soro bovino (BSA) e o dodecilsulfato de sódio (SDS), com pureza de 99%, têm procedência da Sigma. O 9-metilantraceno, MA, procede da Aldrich. O tris(bipiridil)rutênio (II), $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ e o metanol HPLC OmniSol são Merck.

As soluções aquosas de proteína BSA foram preparadas em concentrações 0,2% e 1,0%, sob agitação suave durante 12 horas. As soluções estoques de tampão acetato de sódio, foram preparadas a partir de ácido acético glacial, Aldrich 99,7%, e tituladas com solução de NaOH até pH 5,40, 25,0°C, usando um pHmetro Beckman modelo $\phi 71$, equipado com um eletrodo de vidro combinado. As soluções estoques de MA foram preparadas em concentração de $2,5 \times 10^{-3}$ M em metanol e as soluções de $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, $7,1 \times 10^{-3}$ M, foram preparadas em água destilada.

2. Equipamentos e Métodos

Todas as medidas de condutância foram feitas usando um condutivímetro ATI-ORION modelo 170, equipado com eletrodo de platina e acoplado a uma bureta semi-automática da Metrohm Herisau tipo Multi-Bürette, modelo E-485 com capacidade para 20 mL. A técnica consiste na adição da mistura de SDS-BSA, através de uma bureta automática, sobre um volume conhecido de solução contido numa cela de diluição previamente termostatizada a 25,0 °C.

A variação de tensão superficial foi monitorada num tensiômetro interfacial K8, Krüss GMBH, equipado com um anel Pt-Ir-20, 25,0 °C. Foram usados 10 mL de solução para cada medida. Os valores apresentados são uma média de três coletas de dados.

As medidas de intensidade de fluorescência foram realizadas num espectrofotômetro da Hitachi F-4500, equipado com uma cubeta de quartzo de 10 mm. As medidas de fluorescência da BSA, para estudar o espectro de emissão, foram obtidas com excitação em 280 nm.

O número de agregação, n , de misturas de SDS e BSA, em várias concentrações de tampão foi avaliado acompanhando a intensidade de emissão de fluorescência estacionária, conforme metodologia de Turro e Yekta [31]. A técnica acompanha a supressão da fluorescência do íon $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ pelo supressor 9-metilantraceno ($5 \times 10^{-3} \text{M}$). A excitação e emissão do $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ foram ajustados em 450 e 620 nm, respectivamente, e a velocidade de varredura foi em 240 nm/min.

A concentração molar micelar $[M]$ foi determinada através do gráfico de intensidade de fluorescência, $\ln(I_0/I)$, onde I_0 e I representam as intensidades de emissão na ausência e em presença do supressor, respectivamente, em função da concentração de supressor [22]. O número de agregação n foi estimado através dos valores obtidos pelo gráfico, conforme a eq. 04:

$$\text{coef. angular} = \frac{n}{C_t - \text{cmc}} \quad (04)$$

onde C_t representa a concentração total de surfactante.

As medidas de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, SP. Foram executadas à temperatura de $\pm 22^{\circ}\text{C}$, no comprimento de onda de $1,608 \text{ \AA}$ e distância amostra-detector de 723 mm . As amostras foram seladas em celas de acrílico de 1 mm de espessura, com janelas de mylar, e colocadas em posição perpendicular ao feixe incidente. As curvas obtidas (tempo de exposição de 15 minutos) foram corrigidas por homogeneidade do detector (linear sensível à posição) e normalizados levando em consideração o decréscimo da intensidade do feixe incidente durante a medida experimental. Os espectros finais correspondem a uma média de dados corrigidos para cada amostra estudada.

Neste trabalho foi utilizado os programas de computador ITP e GNOM, que geram funções $p(r)$ relativas às $I(q)$ que melhor se ajustam aos dados experimentais e o programa Crysol que descreve a função de espalhamento de macromoléculas a partir do conhecimento de suas estruturas cristalográficas [27]. No caso de proteínas de baixo peso molecular, existem alguns trabalhos teóricos que calculam $P(q)$. Neste trabalho foi usado o programa *Crysol* que descreve a função de espalhamento de macromoléculas a partir do conhecimento de suas estruturas cristalográficas [27]. Estes estudos foram realizados em colaboração com a Professora Rosângela Itri, do Instituto de Física da USP, São Paulo.

CAPÍTULO III

Resultados e Discussão

1. Condutividade elétrica

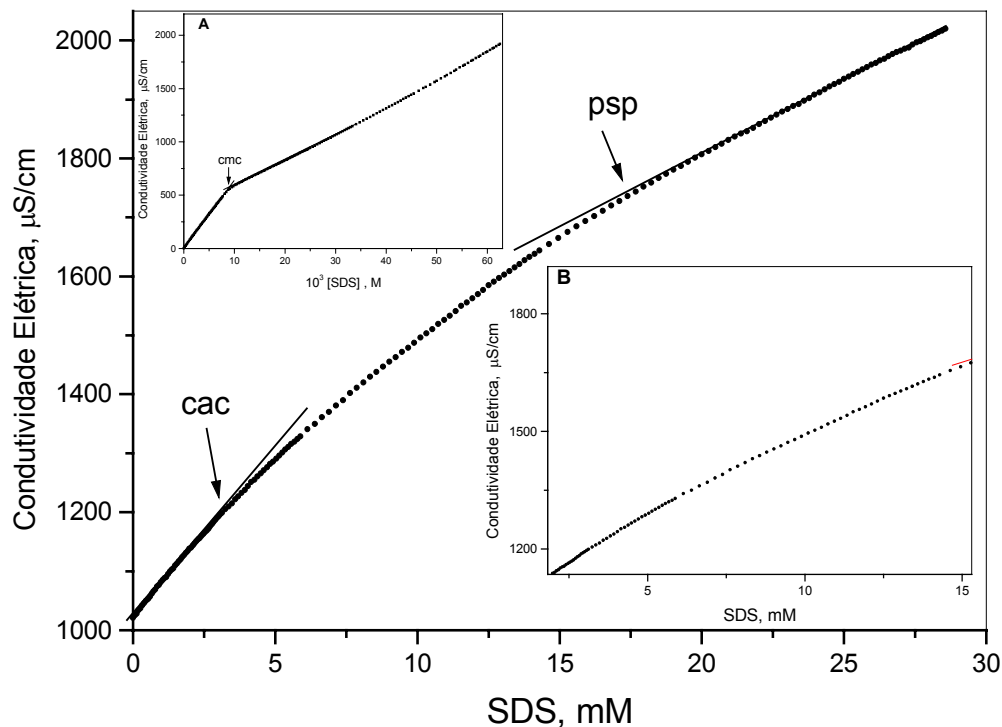
Goddard [17], em uma extensiva revisão, concluiu que a questão “como se formam complexos polímero-surfactantes”, é mais difícil de responder do que a questão “por que eles se formam?”. Vários fatores tem sido apontados como responsáveis pela ligação espontânea entre polímeros e surfactantes. A interpretação mais comum refere-se ao caráter hidrofóbico de polímeros e surfactantes, que não explica, por exemplo, porque surfactantes catiônicos se ligam apenas fracamente com polímeros.

A Figura 12A, mostra o perfil de condutividade elétrica na ausência de BSA e de tampão. A *cmc*, nas condições da experiência, ocorre em **8,6 mM de SDS**. Em baixas concentrações de SDS, à medida que a concentração é aumentada, a condutividade elétrica também aumenta, linearmente, até o início da formação de agregados micelares, *cmc*. Acima da *cmc*, com a adição de mais SDS à solução, a condutividade volta a aumentar, linearmente. Este fato é forte indicação de que os agregados micelares que se formam acima da *cmc* possuem propriedades interfaciais idênticas.

Para misturas de proteína e surfactante (Figura 12), o perfil de condutividade elétrica apresenta dois pontos de inflexão. O primeiro representa o início da associação cooperativa entre a proteína e o surfactante, *cac*, e o segundo à saturação da proteína por moléculas de

surfactante, *psp*. São características ainda duas regiões lineares (i) abaixo da *cac*, (ii) acima do *psp* e (iii) uma terceira não linear entre *cac-psp*, [18].

Figura 12: Gráfico de condutividade elétrica em mistura de SDS e 1,0 % de BSA,



em 20 mM de acetato, pH 5,40. O anexo (A) mostra a *cmc* enquanto (B) enfatiza a não-linearidade acima da *cac* para a mistura SDS/BSA.

O grau de ionização (α) pode ser estimado a partir das razões dos coeficientes angulares das regiões lineares dos gráficos de condutividade elétrica *versus* concentração de SDS [2,8,20], conforme as equações simplificadas 08 e 09.

$$\alpha_1 = S_2 / S_1 \quad (08)$$

$$\alpha_2 = S_3 / S_1 \quad (09)$$

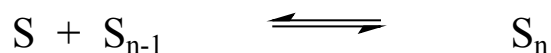
A estimativa de α é melhor interpretada se for considerada sob o ponto de vista dos valores de condutância equivalente λ (em $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$). S_1 representa a contribuição de λ

das espécies iônicas Na^+ e SD^- (ânion dodecilsulfato) presentes na solução, isto é, $S_1 = \lambda_{\text{Na}} + \lambda_{\text{SD}}$. Como acima do *psp* pode-se assumir que a variação da condutividade elétrica é atribuída somente ao desenvolvimento de micelas regulares de SDS, então define-se S_3 como sendo igual a $\alpha(\lambda_{\text{Na}} + \lambda_{\text{SD}})$. Assim, S_2 / S_1 representa α dos agregados formados no complexo BSA-SDS e S_3 / S_1 representa α das micelas de SDS.

A segunda região, em destaque na Figura 12B, localizada entre a *cac-psp*, é definida como mais uma etapa de formação de agregados. Considerando a região inteira, nitidamente ela não é linear. Estas características já foram discutidas, em outros trabalhos, para o sistema contendo polímero neutro, PEO-SDS [3,15,16,18].

Zanette e colaboradores [16,18] usaram a linearidade como argumento para postular o desenvolvimento de somente PEO-SDS ao longo desta faixa de concentração. Observaram que a linearidade estava condicionada à concentração de PEO, limitada, aproximadamente, em 0,05 M de PEO. Os autores postularam a formação de micelas regulares de SDS e complexos PEO-SDS simultaneamente em todos os casos cuja concentração de polímero fosse menor que 0,05 M. A premissa desta conclusão, estava baseada no fato de que a formação dos complexos PEO-SDS seria mais favorável do que a de formação de micelas de SDS. A variação do coeficiente angular nesta região para o complexo BSA-SDS oferece duas interpretações [20]:

i) Se houver formação de um único agregado, isto é, o complexo BSA-SDS, a variação do coeficiente angular, ao longo desta região, necessariamente deve estar relacionada com o processo de associação. Neste caso, o comportamento do perfil de condutividade elétrica colabora com o mecanismo de formação do complexo, via associação cooperativa, ocorrendo em adição de monômeros, S, ao agregado no complexo, S_n , por etapa, conforme



Assim, a *cac* pode ser considerada como a concentração de SDS onde começam a se formar os primeiros agregados com características micelares, pequenos e altamente ionizados. A medida que se aumenta a concentração de SDS, o coeficiente angular

diminui, paulatinamente, porque os agregados crescem e tendem ao grau de ionização, tipicamente micelar, que só alcança no segundo ponto de descontinuidade, aqui denominado de *psp* (*condutimétrico*). Dentro de uma aproximação, e considerando o intervalo de concentração, isto é, entre *cac* e ≈ 8 mM SDS, a estimativa do grau de ionização leva a um valor próximo de 0,8, e este valor representa um agregado e altamente ionizável.

ii) Desenvolvimento de agregados mistos, complexo BSA-SDS e agregados tipicamente micelares normais: Neste caso, a contínua variação, e portanto a diminuição do coeficiente angular, seria o resultado do balanço na contribuição de ambas a espécies, a micela de SDS com baixo grau de ionização e o complexo.

A terceira região é linear e aquela já bem caracterizada na literatura [7,9,18,20]. Como discutido acima, a extensão da variação do coeficiente angular culmina com o ponto de descontinuidade *psp*, onde acima, possui coeficiente angular constante e idêntico àquele do perfil de *cmc* para o SDS nas mesmas condições experimentais (Tabela 04). Este fato, embora ocorra numa concentração bem abaixo daquela esperada para a saturação, por diálise é equívoca a 47 mM [12], não deixa de ser uma forte indicação de que, já no *psp condutométrico*, o agregado no complexo tipicamente tem as características de uma micela regular de SDS.

A Tabela 04 lista os valores dos coeficientes angulares correspondentes às regiões do perfil de condutividade abaixo da *cac* (S_1), ligeiramente acima do *cac* (S_2) (veja razões acima) e em concentrações superiores àquela do *psp* (S_3). Lista, ainda, os valores dos grau de ionização para os agregados no complexo BSA-SDS (α_1) e das micelas de SDS (α_2) em diferentes concentrações de tampão acetato de sódio.

Tabela 04: Valores de Coeficientes angulares e grau de ionização obtido por condutividade elétrica.

[acetato de sódio], mM	<i>cac</i> , mM	<i>psp</i> , mM	S_1	S_2	S_3	α_1	α_2
10	3,3	17,9	56	42	26	0,75	0,46
20	3,3	15,5	56	46	26	0,82	0,46
50	3,3	17,2	56	47	27	0,84	0,48

Observa-se na Tabela 04 que, contrariamente aos sistemas polímeros neutros e surfactante [14,18], o parâmetro *cac* independe da concentração de acetato de sódio e, portanto da força iônica. Uma interpretação para este fato pode estar relacionada com o tamanho dos agregados micelares complexados que devem ser pequenos e, portanto, devem ter alto grau de ionização, $\approx 0,8$. Neste caso, a *cac* não deve ser afetada por variações do conteúdo iônico da solução. No entanto, como o coeficiente angular na região *cac-psp*, progressivamente diminui, neste caso pode-se concluir que há, realmente, interação entre a BSA e o SDS. Santos [20] estudou variações nos coeficientes angulares para sistemas PEO-SDS e BSA-SDS e os valores obtidos de α são semelhantes obtidos neste trabalho.

2.Tensão superficial

A Figura 13 mostra uma combinação dos perfis de tensão superficial na ausência e em presença de 1 % de BSA, em 20 mM de acetato de sódio, pH 5,40. Observa-se que, a medida que se adiciona SDS à solução, a tensão superficial diminui até a ocorrência de uma brusca inflexão, em 37 dina/cm, que é identificada como o início da formação de micelas, *cmc*. A interpretação do platô é de que todo o SDS adicionado localiza-se no interior da solução formando micelas, enquanto que na superfície a concentração monomérica permanece constante.

No entanto, na presença de proteína, o estilo do perfil é outro: observa-se que os valores de tensão superficial diminuem com a adição de SDS até a primeira inflexão em 44 dina/cm (superior aos 37 dina/cm da *cmc*), definida como *concentração crítica de agregação, cac*, que aqui ocorre em **3,3 mM de SDS**. Note que este valor é idêntico ao obtido por condutividade elétrica (Tabela 4). Até esta concentração, entende-se que em solução existam apenas monômeros de SDS e de BSA (Figura13).

A interpretação mais apropriada da diminuição da tensão superficial acima do platô, semelhantemente àquelas condições abaixo da *cac*, é de que os monômeros de SDS estão novamente concentrando-se na superfície, finalizando com um segundo platô, em aproximadamente 37 dinas/cm. O início desta segunda inflexão é associado à saturação das cadeias de proteína, **psp = 42 ± 4 mM**. Acima deste ponto, todo o SDS adicionado forma

micelas regulares de SDS. Esta premissa é sustentada pelo fato de que, acima do *psp*, os valores de tensão superficial são idênticos aqueles acima da *cmc* quando na ausência de proteína, ou seja, iguais aos mesmos 37 dina/cm.

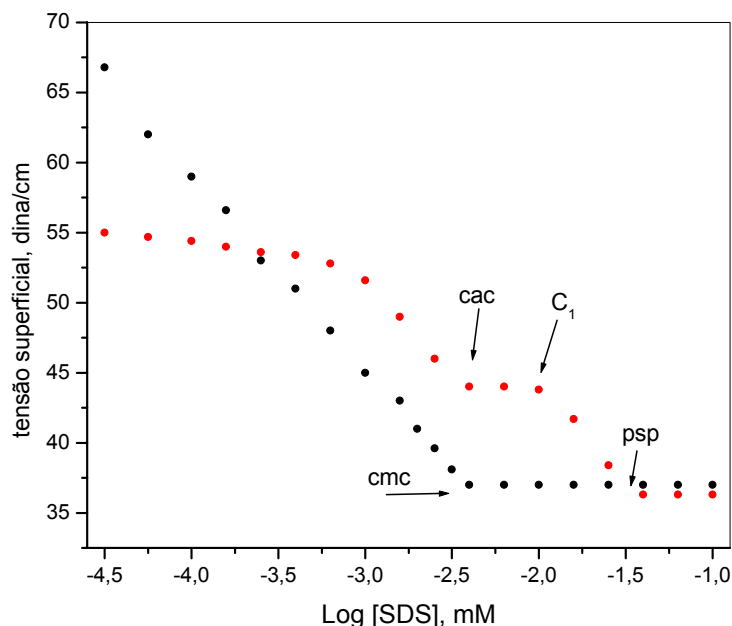


Figura 13: Gráfico de Tensão Superficial *versus* log [SDS] com 20 mM de acetato de sódio, (●) na ausência e em (●) em 1,0 % de BSA, pH 5,40, 25°C .

A Figura 14 mostra que o *psp*, em concentrações 20, 200 e 500 mM de acetato de sódio, assim como a *cac*, não exibe nenhuma modificação importante. Os valores de força iônica correspondentes são 0,016, 0,08 e 0,4 M. Em destaque na Figura 14, está apresentado o perfil de tensão superficial para uma solução, 1% de BSA, contendo 100 mM de NaCl em 20 mM de tampão acetato de sódio. Observa-se, novamente, que o *psp* é independente da força iônica.

Os valores de *cac* medidos por tensão superficial não contradizem os de condutividade elétrica. Os valores de *psp* identificados por tensão superficial, no entanto, diferem, mas são muito próximos daquele que representa a saturação da proteína medido *via* diálise por Reynold e Tanford [12]. Este dado positivo leva-nos a concluir que, mesmo *via* uma medida indireta, o segundo ponto de descontinuidade tensiométrico está ocorrendo

nas proximidades da saturação, fato que permite assumir que esta técnica, dentro de certas limitações, é uma alternativa para medir a saturação de proteínas por surfactantes.

Os resultados invariantes do *psp*, apresentados na Figura 14, serão melhor discutidos e interpretados nos próximos tópicos, bem como as diferenças entre os valores de *psp*, entre o condutivimétrico e o tensiométrico.

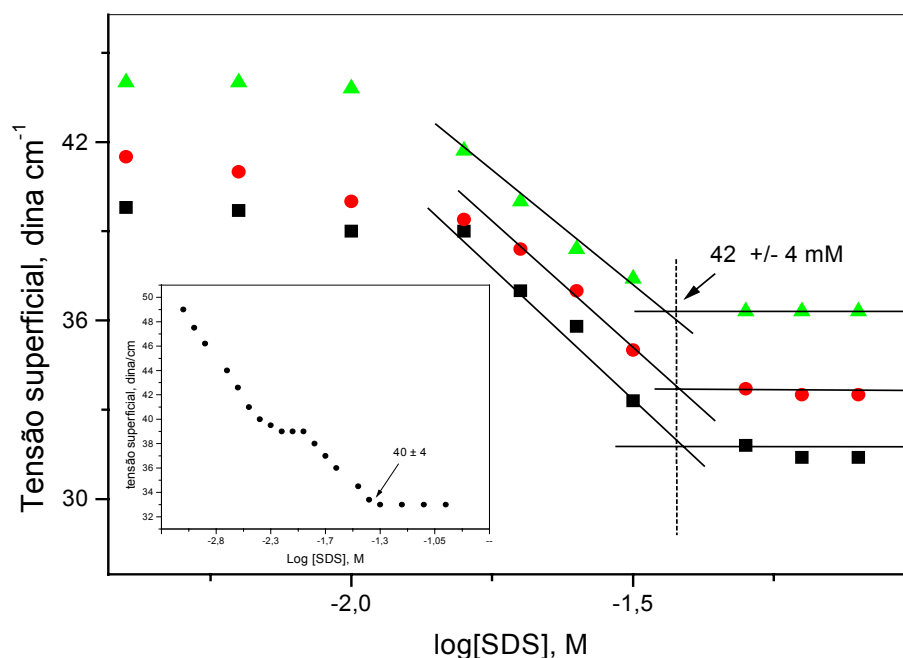


Figura 14: Gráfico de tensão superficial *versus* log [SDS] com 1,0% de BSA e em (▲) 20 mM (◆) 200 mM (■) 500 mM de acetato de sódio. A inserção mostra o gráfico de tensão superficial *versus* 100mM de NaCl, em 20 mM de acetato de sódio, ambas em pH 5,40, 25°C

Os gráficos de tensão superficial, permitem estimar a área molecular ocupada por uma molécula de surfactante na interface água-ar. A área pode ser descrita como o grau de empacotamento e de orientação das moléculas de surfactantes na interface água/ar indicando, então, a efetividade da adsorção na interface água/ar do surfactante[33].

A área molecular pode ser representada pela equação:

$$w = \frac{10^{16}}{N\Gamma_2} \quad (10)$$

onde N é o número de Avogadro e Γ_2 é o excesso de superfície, expresso por número de moles cm^{-2} , definido pela equação 11.

$$\Gamma_2 = - \frac{1}{RT} \left(\frac{\delta \gamma}{\delta \ln C_2} \right)_T \quad (11)$$

Na Tabela 05 estão apresentados os resultados obtidos para o SDS em várias concentrações de acetato, pH 5,40, na ausência de proteína (w) na presença de BSA, onde w_1 é a área molecular ocupada pelo surfactante estimada a partir da inclinação da reta e descrita na região abaixo da *cac* e w_2 é a área estimada entre C_1 e o *psp*.

Tabela 05: Valores de área molecular em presença de BSA

[acetato de sódio], mM	w , Å ²	w_1 , Å ²	w_2 , Å ²
20	29	33,9	35,2
200	20	34,2	33,9
500	19	33,2	31,9

Pode-se observar que as áreas moleculares do SDS, praticamente não variam com o aumento da força iônica, na presença de proteína, e que o sal não causa nenhuma alteração no empacotamento das moléculas de SDS na interface água/ar. Na presença de proteína, a área molecular ocupada é ligeiramente maior do que na ausência. Isso evidencia que o SDS, na ausência de BSA, forma uma interface levemente mais empacotada do que na presença de proteína. Esta diferença está relacionada com a adsorção da proteína na interface competindo, assim, pelo espaço com os monômeros de SDS. Este fato pode ser aceito se for considerado a atividade superficial que as proteínas globulares exibem em solução aquosa. Assim, a Figura 15 mostra a atividade superficial da BSA medida por tensão superficial em função da concentração de BSA. Note que, progressivamente, a tensão superficial, em baixas concentrações, diminui e estabiliza em valores próximos de 55 dinas/cm, quando atinge ≈ 1 % de BSA. Curiosamente, se for analisado o perfil de tensão superficial da Figura 13, em 1 % de BSA, observa-se nas mais baixas concentrações de SDS, o mesmo valor de tensão superficial. Portanto, conclui-se que em baixas concentrações de SDS, e em valores menores do que *cac*, que a proteína compete na superfície, é o óbvio.

Um resultado interessante, é o de que os valores de w_1 e de w_2 são idênticos, indicando que, em concentrações de SDS acima do ponto C_l (Figura 14), o processo de concentração na superfície é reativado após a “parcial” interrupção da formação cooperativa de agregados micelares sobre a proteína iniciada na *cac*. A menção “parcial” deixa em aberto a interpretação, via condutividade elétrica (Figura 13), de que na faixa de concentração entre *cac* e *psp*, o coeficiente linear diminui gradativamente, possivelmente está relacionada com multi-equilíbrios dos monômeros na fase aquosa com aqueles micelizados e aqueles que se concentram na superfície.

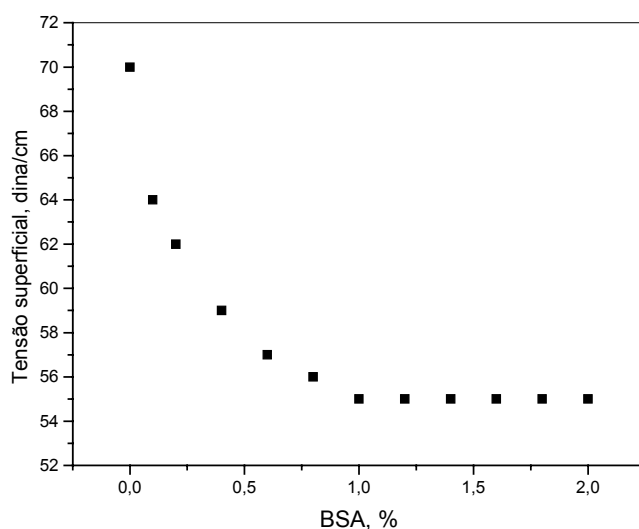


Figura 15: Gráfico de Tensão superficial em função da concentração de BSA (%), em 20mM de acetato de sódio e em pH 5,4

Existe um questionamento em torno do significado do *psp condutométrico*, isto é, se ele representa ou não um ponto de saturação da cadeia protéica por moléculas de SDS, uma vez que este parâmetro comporta-se de modo análogo ao sistema PEO-SDS [16]. Entende-se que a interpretação deste parâmetro deva estar relacionada com o mecanismo de desnaturação da proteína. Tanford e Reynolds [12], por diálise, concluíram que o ponto de saturação ocorre em 1,35 g de SDS/g BSA e varia pouco com outras proteínas. Esta quantidade que representa 0,047 M de SDS/g BSA é muito diferente da encontrada na condutividade elétrica de $\approx 0,017$ M de SDS/g BSA.

3. Fluorescência da BSA

Informações sobre a natureza dos agregados entre proteína-surfactante podem ser obtidas através da fluorescência dos resíduos do triptofano da cadeia protéica. Na prática, o espectro observado representa a média dos efeitos causados sobre os dois triptofanos da BSA nos seus respectivos microambientes da estrutura da proteína. Assim, a partir dos espectros de emissão de fluorescência, primeiramente é possível observar o efeito de supressão. Este fato é monitorado acompanhando a diminuição da intensidade de fluorescência ou, alternativamente, da área da banda de emissão, causada pelo aumento da concentração de SDS. Neste caso, a supressão é uma medida direta do contato físico dos monômeros (particularmente do grupo polar) com os resíduos de triptofano.

Uma segunda observação relevante é com relação ao deslocamento da banda de emissão. A posição no espectro da banda de emissão, dependente da polaridade do solvente. Assim, por exemplo, a BSA nativa em pH 7,0 emite em 342 nm enquanto que em 0,2 % de SDS ocorre em 332 nm [10]. O deslocamento para menores comprimentos de onda tem sido atribuído à diminuição da polaridade do microambiente onde localizam-se os resíduos [30].

Neste trabalho, as variações podem ser interpretadas como uma medida direta da ligação de agregados tipicamente micelares nos sítios da proteína no mesmo local onde se localizam os triptofanos. Enfatiza-se que a polaridade da superfície micelar é avaliada para ser próxima da polaridade de um álcool enquanto que o interior da micela assemelha-se à polaridade de um hidrocarboneto.

A Figura 16 representa a área normalizada dos espectros de emissão da BSA com incrementos de SDS. O significado do perfil pode ser assim interpretado:

(i) Em baixas concentrações de SDS, a intensidade da banda de emissão em 341 nm rapidamente diminui, exibindo uma supressão de cerca de 60 % da intensidade inicial da fluorescência, aquela quando na ausência de SDS. Observa-se ainda que, nesta primeira etapa, a supressão é parcialmente interrompida em concentrações de SDS próximas da *cac*. Neste etapa, então, a supressão é resultado do contato físico dos monômeros de SDS com os resíduos de triptofano localizados nos mesmos sítios da proteína onde os monômeros também se ligam especificamente. Note que a ligação

específica de monômeros em concentrações de surfactantes abaixo da *cac* já tem sido medida e identificada por diálise [12], por sondas fluorescentes [21] e também por condutividade elétrica [20]. É importante ainda salientar que, nesta faixa de concentração de SDS, a banda de emissão (Figura 16 inserida) não se desloca indicando que, embora a fluorescência é suprimida, os resíduos de triptofano não sentem mudanças de polaridade. Este fato é previsível já que a forte supressão está ocorrendo abaixo da *cac*.

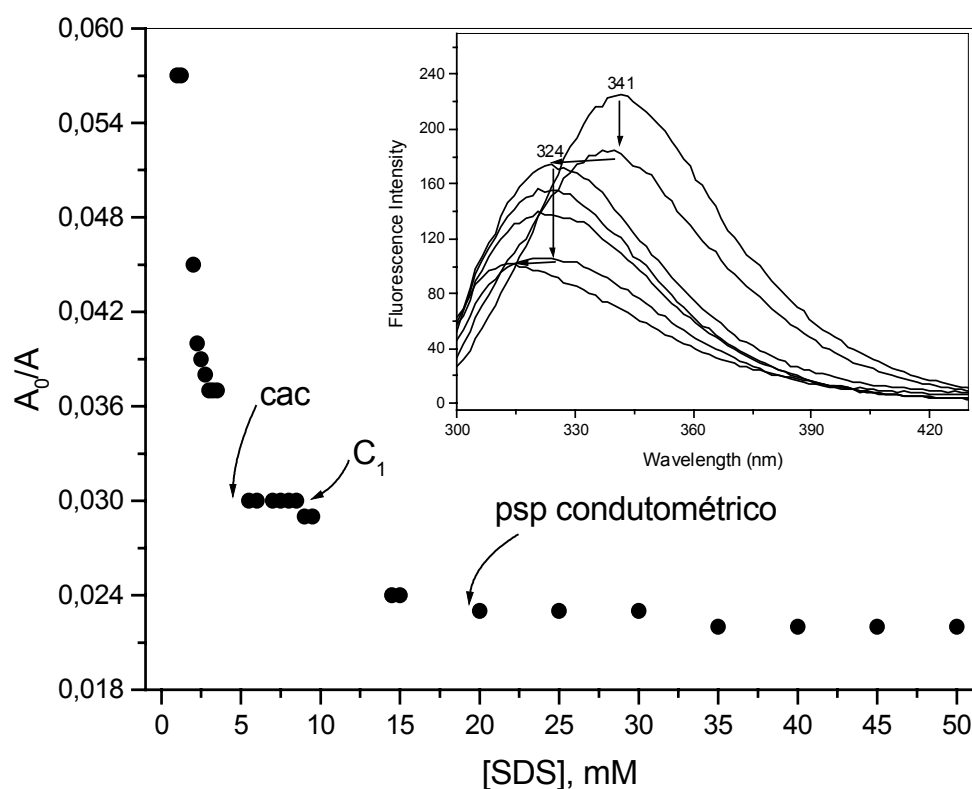


Figura 16: Áreas normalizadas dos espectros de emissão da BSA em função da concentração de SDS e na inserção as bandas de emissão de fluorescência em várias concentrações de SDS, ambas em 20 mM de tampão succinato de sódio, pH 5,40 com 1,0 % de BSA

(ii) Da *cac*, até ≈ 5 mM de SDS, a intensidade permanece aproximadamente constante (Figura 16), no entanto, a banda de emissão desloca-se para 328 nm (veja destaque na Figura 16). Se o deslocamento está vinculado com mudanças de polaridade, entende-se que acima da *cac*, onde sabe-se que inicia um processo cooperativo (formação de agregados micelares) de ligação de SDS à proteína, nos sítios onde os agregados começam a ser formados, os resíduos de triptofano sentem um ambiente menos polar, aquele dos agregados tipicamente micelares.

(iii) Acima de 10 mM de SDS, observa-se novamente supressão da fluorescência indicando que, a cada adição de SDS, aumenta o efeito de supressão até tornar-se constante em ≈ 18 mM de SDS. É importante notar que a constância da intensidade a partir de 18 mM do surfactante, é coincidente com o *psp condutométrico* (Figura 12). Conclui-se, portanto, que no *psp condutométrico* os triptofanos da BSA sentem invariavelmente a mesma polaridade e interação com os monômeros de SDS. Finalmente, conclui-se ainda que os resíduos de triptofano devem localizar-se nos domínios da BSA onde definitivamente ocorre a associação cooperativa de SDS é desenvolvida. No entanto, a conclusão mais significativa destes experimentos, é a de que a supressão é encerrada coincidentemente em níveis de SDS no quais o perfil de condutividade elétrica indicam que agregados micelares com as propriedades regulares das micelas de SDS estão sendo formados.

Os resultados obtidos até aqui, no entanto, não explicam a razão da falta de sensibilidade do *psp* frente às mudanças de força iônica, nem tão pouco, o significados do *psp* na curva de condutividade elétrica e da diferença entre os dois segundos pontos de descontinuidade, assim, os perfis de condutividade elétrica e o de tensão superficial. A possibilidade questionada seria a de avaliar os tamanhos dos agregados nos complexos (número de agregação) na faixa de concentração de SDS de 20 a 100 mM em concentrações de acetato de sódio entre 20 e 200 mM.

3.1. Medidas de número de agregação de agregados micelares

O número de agregação é um importante parâmetro na caracterização morfológica de agregados micelares no complexo proteína-surfactante [16]. A determinação do número de monômeros por agregado micelar presente em solução, estaria aqui apresentada como uma possibilidade adicional para monitorar o tamanho das micelas e, então, relacioná-las com o tipo de agregado presente em cada fase da interpretação dos perfis condutométricos e tensiométricos. Ele indica o número de monômeros de surfactante por unidade micelar podendo informar acerca do tamanho de agregados presentes em solução.

Neste trabalho, foi utilizado o método das mudanças de intensidade de fluorescência da sonda luminescente rutênio bispíridíneo, $\text{Ru}(\text{bipy})_2^{2+}$, seguindo a supressão da fluorescência por adição do 9-metilantraceno (MA). A escolha do método foi feita com base nas vantagens (i) a do MA favoravelmente de ligar-se aos agregados aniônicos, por apresentar baixa solubilidade em água, e (ii) porque a sonda tende a localizar-se na interface micelar por ser uma espécie positiva de carga contrária, então, à carga superficial de micelas de SDS. Contudo, este método apresenta algumas restrições, já questionadas por alguns autores [11,21,22]. Neste trabalho, o número de agregação foi estimado assumindo que todos os componentes, monômeros, sonda e supressor estão micelizados.

Turro e colaboradores [31] usaram o mesmo critério para estabelecer uma correlação entre formação dos agregados e desenvolvimento do processo de ligação de SDS à BSA. Eles pretendiam discutir as etapas de desnaturação da proteína até a saturação e, supostamente, aparecimento de micelas regulares de SDS.

Enfatizamos que Shinagawa e colaboradores [23] estudaram, para o sistema BSA-SDS, a variação da concentração de sal na faixa de 0 a 500 mM de tampão, e sugeriram que a quantidade de SDS ligado aumentava de 1,0 para 2,2 g/g, portanto superiores ao valor identificado por Reynolds e Tanford [12]. Os autores procederam os estudos com a cadeia polipeptídica totalmente aberta via oxidação e carboximetilação da BSA. De outro lado, por SANS, Guo e colaboradores [13] para o sistema dodecilsulfato de lítio e BSA, encontraram valores pequenos, semelhantes aos encontrados por Turro e colaboradores [11]

via supressão de fluorescência. Estes desenvolveram os trabalhos em 0,2 e 0,6 de força iônica.

Os gráficos foram *plotados* em $\ln(I_0 / I)$ *versus* [MA] e as correlações lineares obtidas foram iguais ou superiores a 0,999. A Figura 17 mostra alguns perfis representativos, dependência da intensidade de luminescência com a concentração do supressor em diferentes concentrações de SDS. Observa-se que a intensidade de supressão de fluorescência aumenta se a concentração de SDS é aumentada. Esta relação é interpretada com base no fato de a sonda luminescente liga-se preferencialmente aos agregados aniônicos.

O tamanho dos agregados foi monitorado, em função da concentração de SDS e de sal. De modo geral, o tamanho de agregados micelares tende a aumentar com o aumento da concentração de surfactante [11,16,18]. De outro lado, tem sido já sugerido, para os complexos polímero-surfactante, que os agregados no complexo PEO-SDS também aumentam com a adição de sal [16].

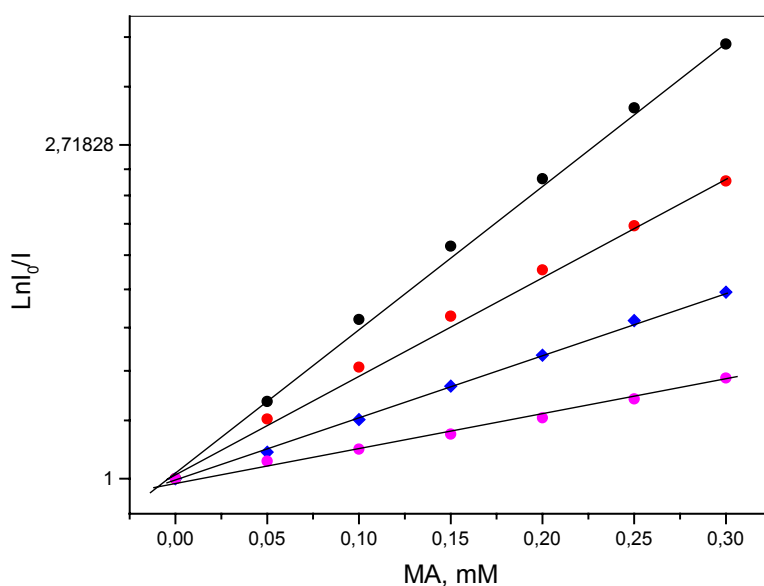


Figura 17: Gráfico de $\ln(I_0/I)$ *versus* concentração do supressor 9-metilantraceno (MA), na presença de 1% de BSA e 50 mM de acetato de sódio, pH 5,40 nas concentrações de SDS de (●) 20 mM, (♦) 30 mM, (♦) 50 mM e (●) 100 mM.

Sabe-se que micelas de SDS regulares e esféricas, $n = 60$, só existem em água pura e nas proximidades da *cmc*. Com o aumento da concentração de SDS, aumenta a força iônica na fase aquosa por causa dos incrementos em α_{Cd} de contra-íons Na^+ dissociados. Este fato suprime o potencial de superfície, estabiliza as micelas e o resultado deste efeito é o crescimento dos agregados. Este efeito pode ser analisado na Figura 18. Observa-se que, entre 20 e 50 mM de SDS, o número de agregação progressivamente aumenta de ≈ 30 a ≈ 54 . Sob o ponto de vista dos resultados de condutividade elétrica pode-se em uma primeira tentativa, a de associar o intervalo de 20 e 50 mM de SDS, a um processo de crescimento dos agregados micelares no complexo BSA-SDS. Este fato também não contradiz os valores constantes das áreas A_o/A acima de 20 mM de SDS. A lógica é a de que, a constância de A_o/A , implica em término do efeito da supressão porque o sistema, micela-triptofano e o processo de ligação de monômeros, está estabilizado no que concerne ao efeito de supressão.

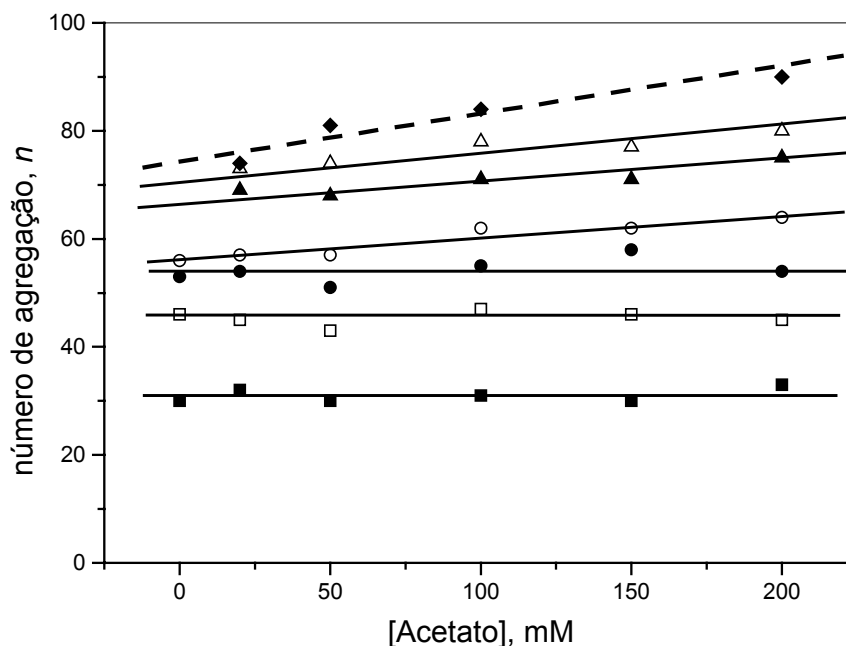


Figura 18: Variação do de número de agregação em diferentes concentrações de tampão, para agregados micelares de SDS em (◆) 50 mM de SDS quando na ausência de BSA e em 1% de BSA em (■) 20, (□) 30, (●) 45, (○) 50, (▲) 80, (△) 100 mM de SDS.

Um resultado, considerado inicialmente como não usual, é o fato de que, nas concentrações de 20, 30 e 45 mM de SDS, os agregados no complexo não sentem o efeito da concentração de tampão e, em consequência, ao efeito do aumento da força iônica.

Nestas condições, os agregados, praticamente, ignoram o aumento de força iônica, contrariamente ao comportamento normal de agregados micelares [11,16,18]. Note que esta faixa de concentração de SDS está compreendida entre os dois patamares do perfil de tensão superficial da Figura 13 cuja interpretação, associada à diminuição da tensão superficial, havia sido sugerido um sistema de multi-equilíbrio dos monômeros, com a interface água-ar e com os agregados no complexo. Enfatiza-se que este intervalo precede de um patamar no qual a tensão superficial é constante, indicação de que a ocupação dos sítios de ligação da proteína é a força preferencial. Nesta etapa, entende-se que, parte do SDS adicionado associa-se à proteína com crescimento dos agregados.

Supondo que ao sítio de ligação, hidrofóbico, pudesse ser associado a uma “cavidade hidrofóbica” onde a ocupação é limitada pelo volume da cavidade, então, em concentrações de SDS entre os dois patamares, a retomada da ação de reconcentrar monômero na superfície poderia ser interpretada como um deslocamento parcial do equilíbrio para a superfície ainda não saturada, enquanto os agregados nos sítios ainda crescem. Como a força maior é a hidrofóbica, nesta etapa, o efeito salino pode ser tomado como um efeito secundário e não importante.

O resultado final observado é de que, enquanto as “cavidades hidrofóbicas” acomodam continuamente monômeros, entre 20 e 45 mM de SDS, observa-se que o número de agregação médio aumenta com o aumento da concentração de SDS até a saturação (Figura 18) .

Acima de 50 mM de SDS (Figura 18), os gráficos de n versus [acetato] deixam de ser constantes e indicam um pronunciado aumento de n com a concentração do tampão. Desde que a saturação ocorra em **≈ 47 mM de SDS**, seria razoável concluir que, como existe a formação de micelas regulares de SDS, logo, estariam sujeitas ao aumento da força iônica do meio e ao aumentando de tamanho. Por fim, a Figura 16 mostra resultados de n versus concentração de acetato, em 50 mM de SDS mas na ausência de proteína. O gráfico obtido indica dois pontos relevantes:

- (i) Primeiramente, como era de se esperar, os agregados micelares são maiores do que os correspondentes agregados no complexo BSA-SDS;
- (ii) (ii) que o tamanho aumenta com a concentração de acetato, semelhantemente aos demais dados acima de 50 mM de SDS em 1 % de BSA; Finalmente, a taxa de aumento de n na ausência de BSA é muito semelhante àquela em presença em 50, 80 e 100 mM de SDS.

Assumindo que em concentrações acima de 45 mM de SDS, formam-se micelas regulares de SDS e elas crescem com aumento da concentração da força iônica, logo a contribuição no acréscimo de n acima de 50 mM de SDS, é devido às micelas regulares presentes em solução. A formação de micelas regulares ou se assim se pudesse afirmar, de uma *cmc* em **42 ± 4 mM de SDS** indicada pelo perfil de tensão superficial (Figura 13), reforça que acima deste ponto, tem-se micelas regulares de SDS.

Com base neste presente modelo, pode-se então propor que a saturação é um processo combinado: (i) o da formação do complexo BSA-SDS que pode ser identificado no *psp condutométrico* (Figura 12), e (2) o crescimento dos agregados no complexo BSA-SDS até na saturação, identificada pelo segundo ponto de descontinuidade na curva de tensão superficial. A saturação seria, então, determinada pelo preenchimento de todos as “cavidades hidrofóbicas” em cuja concentração de SDS define-se a saturação da proteína.

O crescimento dos agregados em concentrações abaixo da saturação, já tem sido documentado por outros [20,31]. Recentemente, Santos e col. [20] observaram que a anisometria dos agregados variavam de 1 a 1,3, entre 10 a 50 mM de SDS e que acima, até 80 mM, a anisometria permanecem constante. Este fato concorda com este modelo, indicando que o SDS desenovela a proteína até o *psp* tensiométrico, ocupando as cavidades hidrofóbicas da macromolécula, independente da concentração salina.

Finalmente, com base na primeira consideração, as micelas regulares formadas a partir da saturação, são responsáveis pela contribuição no aumento do número de agregação médio, enquanto os agregados no complexo estão inalterados e a proteína saturada.

4. Medidas de SAXS

Num trabalho anterior [20], a técnica de SAXS foi usada para acompanhar o efeito de SDS sobre a conformação da BSA. Os autores observaram que o tamanho dos agregados micelares do complexo BSA-SDS aumentavam com a concentração de SDS. Em concentrações de SDS inferior a 2 mM, as curvas de espalhamento obtidas eram idênticas às aquelas em que havia apenas BSA. Os autores estimaram ainda que o raio de giro da proteína aumentava de 32 Å na estrutura nativa para 39 Å em 5 mM de SDS, indicando somente uma ligeira mudança de estrutura da proteína. De outro lado, Turro e Lei [11], quando em pequenas [SDS] e abaixo do cac, sugeriram que a BSA somente liga especificamente molécula de SDS via interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas. Acima de 10 mM de SDS, no entanto, a Figura 18 mostra claramente o aparecimento de um pico em $q \approx 0,15 \text{ Å}^{-1}$, que torna-se mais intenso, definido, e se desloca para valores de q menores enquanto a concentração molar do SDS é aumentada. Tal pico é característico da formação de agregados tipicamente micelares, refletindo a estrutura interna (fator de forma) da micela nas medidas de SAXS.

As curvas de SAXS foram analisadas considerando o modelo estrutural do complexo BSA-SDS equivalente ao do “colar de pérolas” (Figura 05). Os resultados mostravam que os agregados, cerca de cinco, eram distribuídos ao longo da cadeia peptídica semi-aberta. Estes pequenos agregados, a partir de 10 mM de SDS, cresciam com forma esférica, mudando para pequenos elipsóides até 50 mM de SDS. Notem que esta concentração é consistente com o ponto de saturação determinado por tensão superficial.

No caso de micelas de SDS, quando na ausência de proteína, as curvas de SAXS mostram um segundo pico mais interno em torno de $q \approx 0,04 \text{ Å}^{-1}$ que é atribuído à interação entre micelas com carga superficial [27]. Tal pico depende do pH e é associado ao tipo de solução tampão utilizada para ajustar o pH, contribuindo, assim, para blindagem total ou parcial da superfície das micelas. O que é interessante, é o fato de que o pico de interação desaparece nas curvas de SAXS contendo BSA e SDS indicando, assim, que os agregados micelares no complexo devam estar blindados induzidos pela interação com a cadeia polipeptídica [27]. Este fato também complementa o modelo aqui proposto, o de que na interação micelar nas cavidades mais hidrofóbicas, os grupos polares da cadeia peptídica

interagem com a camada de Stern da micela. Enquanto os resultados de supressão de fluorescência também induzem à mesma discussão, por ressonância eletrônica de spin e por ressonância magnética nuclear de deutério, os resultados seriam consistentes com uma estrutura do complexo de forma que a BSA estaria predominantemente ligada ao longo da parte exterior da micela, que corresponde ao longo da camada de Stern. Uma outra conclusão que os autores relatam como uma consequência imediata, é a diminuição do potencial de superfície.

No presente trabalho, foram acompanhadas a variação da intensidade do espalhamento de raio-X a baixos ângulos, $\lambda = 1,608 \text{ \AA}$, em 1% de BSA, em presença de 20 e 500 mM de acetato de sódio, pH 5,40. A Figura 19 mostra os perfis obtidos para as curvas de SAXS, em diferentes concentrações de tampão acetato, na ausência de SDS, em intensidade de espalhamento $I(q)$ versus módulo do vetor de espalhamento $q = 4\pi/\lambda \sin\theta$, onde λ é o comprimento de onda da radiação e 2θ é o ângulo de espalhamento.

A análise qualitativa das curvas indicam que a BSA, na forma nativa (na ausência de SDS), não é afetada pela força iônica do meio, como pode ser visto na Figura 19. Esta experiência foi executada para monitorar a influência da concentração do tampão.

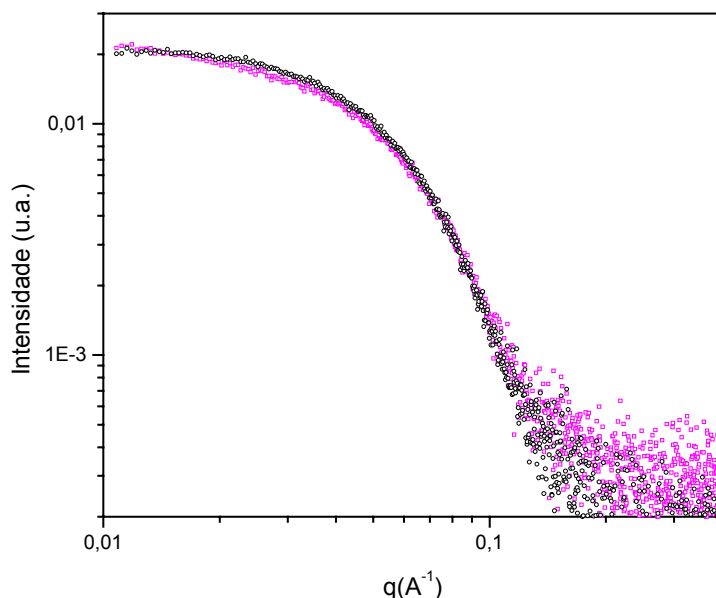


Figura 19: Curva de SAXS para soluções compostas por 1% de BSA, em (■) 20 mM e em (■) 500 mM de acetato de sódio, pH 5,4 e ausência de SDS.

A Figura 20 mostra o perfil de uma curva de SAXS para a BSA sem e com 50 mM de SDS. A comparação entre os perfis é evidente a presença de um pico em aproximadamente de $0,16 \text{ } q \text{ (}\text{\AA}^{-1}\text{)}$, que é característico de estrutura micelar. Deve-se enfatizar que este pico não é definido na curva de SAXS para concentrações de SDS inferior a 10 mM, embora a *cac* do SDS, nas condições experimentais, seja inferior a este valor. Este pico torna-se mais intenso e se desloca para q menores com a adição gradativa de SDS (de $q \cong 0,2$ para 20 mM, decresce até $q \cong 0,16$ em 100 mM), indicando crescimento micelar [27].

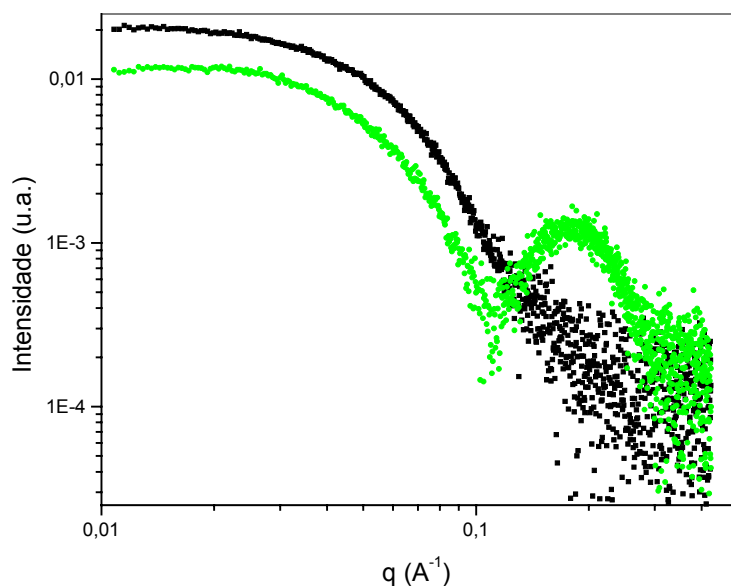


Figura 20: Curva de SAXS para soluções compostas por 1% de BSA, em
 (●) ausência e em (●) 50 mM de SDS, em 20 mM de acetato de sódio, pH 5,4

A partir das curvas de SAXS, foi determinado a função de distribuição de distâncias $p(r)$ que nos fornece informações sobre a forma e a dimensão máxima dos objetos espalhadores, usando o programa de computador GNOM. Os resultados não serão aqui apresetados por serem muito semelhantes aos observados por Santos e col. [20]. Os valores de R_g e de $D_{\text{máx}}$ crescem com a adição de SDS até cerca de 50 mM, indicando que a proteína está aumentando de tamanho e os valores de anisometria, aumentam de 1,01 para

10 mM de SDS até 1,3 em 50 mM e SDS e então estabilizam. O parâmetro anisometria indica, então, que o agregado micelar cresce somente até 50 mM de SDS. Estes valores concordam com os resultados de tensão superficial e de número de agregação (Figuras 14 e 18, respectivamente), e vão de encontro ao modelo proposto. Ou seja, após cerca de 50 mM de SDS todo o surfactante adicionado a solução forma micelas normais em solução e não mais se ligam com a proteína. A Figura 21 apresenta as $p(r)$ feitas para solução de BSA em ausência e em presença de 5 mM de SDS.

Pode ser observado que em ausência de SDS a proteína apresenta a forma de um elipsóide (ver Figura 09). Porém com a adição de 5 mM de SDS a curva de distribuição é bem diferente, mostrando valores de $D_{\text{máx}}$ e R_g maiores, indicando que a BSA está de desenovelando a medida que SDS é adicionado.

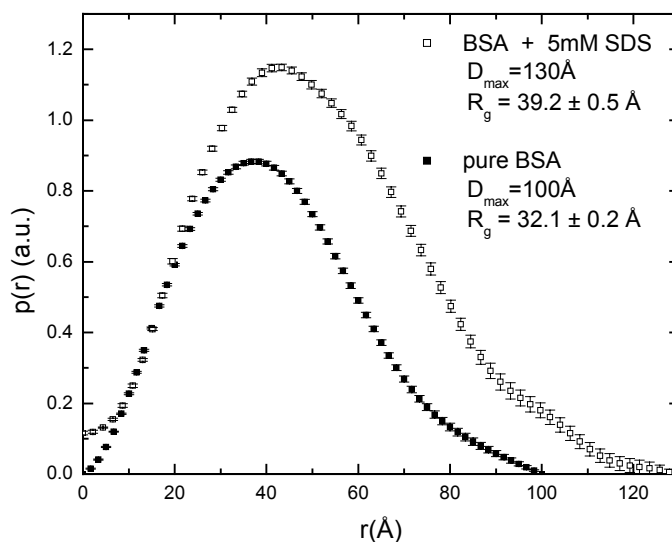


Figura 21: Funções $p(r)$ obtidas para (a) 1,0% de BSA em pH=5,40 com $D_{\text{máx}} = 100 \text{\AA}$ e $R_g = 32 \pm 0,3 \text{\AA}$ e (b) 1,0 % de BSA em presença de 5 mM de SDS com $D_{\text{máx}} = 130 \text{\AA}$ e $R_g = 39 \pm 0,7 \text{\AA}$

Com o propósito de acompanhar a variação do pico da micela nas proximidades do ponto de saturação da proteína, foram obtidos os perfis de espalhamento de raios-X em concentrações de acetato entre 20 e 500 mM. A Figura 20 apresenta os resultados de SAXS obtidos, em diferentes concentrações de tampão acetato, em 50 mM de SDS.

Os dados de SAXS indicam que o pico micelar em $q \approx 0,17 \text{ \AA}^{-1}$ não se altera com o aumento da força iônica, indicando que em 50 mM de SDS, está nas proximidades do *psp*, os agregados não crescem, por aumento da força iônica. Tal observação concorda com os resultados de fluorescência (Figura 18), cujos valores de n são praticamente constantes dentro das incertezas experimentais avaliadas.

Vale a pena ressaltar que, as curvas de SAXS dos complexos de BSA-SDS são diferentes daquelas obtidas de soluções compostas apenas por micelas de SDS na ausência de proteínas. O pico intra-micelar é deslocado para menores valores de q na curva de espalhamento para micelas puras de SDS em relação a do complexo BSA-SDS, indicando a formação de micelas maiores em soluções sem proteínas. Estes resultados também concordam com os resultados de obtidos por fluorescência para n , Figura 18.

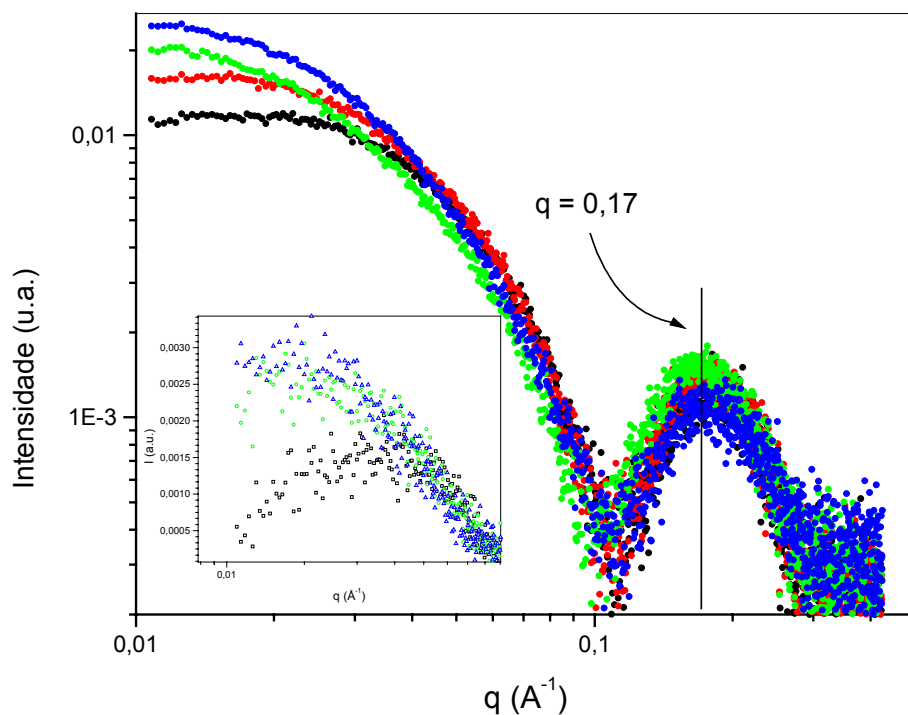


Figura 22: Curva de SAXS para soluções compostas por 1% de BSA, em (●) 20 mM (●) 50 mM (●) 200 mM e (●) 500 mM de acetato de sódio, pH 5,4 e em 50 mM de SDS. A inserção destaca a região em baixos valores de q

Um ponto importante para ser ressaltado é o comportamento diferente das curvas de SAXS em $q \approx 0,025 \text{ \AA}^{-1}$ (ver anexo da Figura 20). Conforme pode-se observar existe um aumento de intensidade (e de inclinação) com o aumento da força iônica do sistema. Isto é porque em 20mM de tampão acetato, existe uma função de interferência intermicelar nesta região de q , devida a superfície carregada das micelas. O aumento da força iônica blinda a superfície micelar, conduzindo ao desaparecimento da função de interferência e, como consequência, ao aumento de intensidade e de inclinação das curvas de SAXS.

CAPÍTULO IV

Conclusões

O ponto de saturação da albumina, bem como o início da formação dos agregados micelares, não varia com o aumento da força iônica do meio, conforme resultados obtidos por tensão superficial, fluorescência estacionária (número de agregação), e SAXS:

- ✓ Seguramente, a primeira conclusão de que o *psp* não é afetado pela força iônica, reflete sobre a estabilidade dos agregados micelares ligados à proteína;
- ✓ Os resultados sugerem um modelo de interação onde a ligação ocorre até a saturação das “cavidades hidrofóbicas” da proteína, acomodando continuamente monômeros de surfactantes, entre 20 e 45 mM de SDS, e observa-se que o número de agregação médio aumenta com o aumento da concentração de SDS até a saturação. Nestas condições, os agregados ignoram o aumento de força iônica;
- ✓ Acima de 50 mM de SDS , é observado um aumento pronunciado de n com a concentração do tampão. Desde que a saturação ocorre em ≈ 47 mM de SDS, seria razoável concluir que, como existe a formação de micelas regulares de SDS, logo, estariam sujeitas ao aumento da força iônica do meio e ao aumentando de tamanho;

CAPÍTULO V

Perspectivas

Os resultados da variação da força iônica do meio contendo proteína e surfactante gerou uma série de questionamentos relacionados com o mecanismo e com a capacidade da proteína em ligar surfactante aniônico. Com o mecanismo porque, até agora, em geral se aceita que proteínas ligam surfactantes, primeiramente via interações específicas, eletrostáticas quando proteína e surfactante estão de sinais contrários, ou via forças hidrofóbicas cujos agregados devem desenvolver em sítios mais hidrofóbicos típicos das que ocorrem proteínas globulares. Esta propriedade está relacionada com a atividade principal da albumina na corrente sanguínea, como a de transporte de aditivos lipossolúveis, portanto insolúveis em água, como os lipídios e gorduras em geral.

De outro lado, quando os resultados de condutividade elétrica e de tensão superficial são analisados, os perfis são típicos daqueles que ocorrem com outros polímeros e SDS, seja com polieletrólitos como com aqueles não-iônicos. Este fato leva à interpretação e à conclusão, como foram aqui desenvolvidas, de que proteínas globulares como a BSA, ligam-se agregados micelares como os demais polímeros.

Assim, a primeira proposta deste trabalho, a de estudar efeito salino sobre misturas de BSA e SDS, originou com o objetivo de identificar a reação desses agregados frente à ação da mudança de força iônica do meio. Os resultados esperados e a discussão deles, estariam fundamentados naqueles mesmos de outros sistemas já conhecidos, como micelas e complexos polímero-surfactante. Assim, primeiramente, poderia-se prever que, embora o

mecanismo de ligação de BSA e SDS é melhor descrito via multi-etapa, portanto diferente daqueles outros sistemas, os resultados provindo do agregado micelar formado no complexo, estes deveriam ser idênticos. Bem, o que nos observamos nos parâmetros analisados, o texto deste trabalho se encarrega de contar o resto da discussão.

Uma segunda alternativa de discussão dos resultados sobre efeito salino, estaria relacionada com uma discussão mais ampla referente aos resultados dos principais trabalhos já publicados nesta área. Este ponto foi bastante enfatizado na *Introdução* e nos *Objetivos* desta dissertação.

Chamamos especial atenção ao trabalho de Shinagawa e col. [23] , sobre a colocação em xeque os trabalhos que enfatizavam capacidade da BSA em ligar SDS em condições experimentais de força iônica alta. Nominalmente, criticaram o clássico resultado de Reynold and Tamford [12] sobre a capacidade das proteínas ligarem a 1,4 g/g de SDS. No entanto, a diferença dos demais trabalhos com o deles era de que eles modificaram a proteína, quimicamente e, presumidamente, o objetivo seria, diferente dos objetivos dos demais autores, o de acompanhar a capacidade de ligação de SDS a BSA, não mais como uma proteína globular sendo desestruturada por um surfactante aniônico, mas sim o de um polipeptídeo cuja estrutura seria equivalente a de um polieletrólito naquelas condições experimentais investigadas como no caso, no pH e nas concentrações do tampão. Supõe-se, então, que os resultados nos dois sistemas, isto é, BSA nativa e BSA modificada, não devam realmente ser os mesmos.

De fato, o efeito salino desenvolvido neste trabalho, sobre misturas BSA-SDS, está longe de ser semelhante aos resultados de Shimagawa e Col. Uma possibilidade é a de que o SDS não abre parcialmente a proteína e interage sem quebrar as pontes de sulfeto.

De outro lado, diversos autores já usaram o critério “universal” de tratar proteínas com mercaptoetanol como agente químico para quebrar as pontes de sulfeto e mediram propriedades, como número de agregação, supondo a cadeia totalmente estendida. E mais do que isto: no método PAGE, eletroforese por gel de (poli(acrilamida))-SDS, técnica “universalmente” usada para análise de misturas e peso molecular de proteína, as amostras

são tratadas previamente com SDS e mercaptoetanol supondo que as proteínas são totalmente desnaturadas e que, no gel eletroforético, comportam-se como polipeptídios.

Salientamos que, no contexto geral desta discussão, o conhecimento do ponto de saturação e acompanhado de suas características, é o ponto principal da discussão.

Proposta de Trabalho

Basicamente o trabalho vai ser centralizado nos estudos com a BSA em condições de desnaturação, como orienta as normas, quebrando as pontes de sulfeto com adição de níveis adequados de mercaptoetanol.

1. As melhores condições serão monitoradas via o método PAGE em colaboração com professor Hernán Terenzi, que faz parte deste colegiado do curso de Pós-Graduação em Química. A idéia é a de identificar as melhores níveis e controle de tempo de reação de desnaturação via método e padrões eletroforéticos. Complementa-se o trabalho com a identificação cromatográfica da complexação de SDS em função da concentração do surfactante com e sem o tratamento com mercaptoetanol e o efeito salino nestas condições.
2. Determinação dos parâmetros de ligação, início da associação de SDS a proteína e condições de saturação *versus* efeito salino utilizando as duas técnicas básicas, condutividade elétrica e tensão superficial.
3. A técnica de supressão de fluorescência estacionária da banda da emissão do triptofano será utilizada para acompanhar a abertura da cadeia peptídica pelo surfactante e justificar a associação dele a domínios hidrofóbicos da estrutura da proteína. A mesma técnica será utilizada para identificar a influência da mudança de força iônica do meio sobre o tamanho dos agregados micelares ligados ao complexo BSA-SDS.

4. O grau de mudança da estrutura secundária da proteína para as nossas condições, será acompanhado por dicroísmo circular, experiências que deverão ser executadas Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Resultados preliminares já foram feitos e indicam que deve ser uma técnica vantajosa na elucidação das mudanças estruturais da proteína.
5. A vantagem deste projeto é a de que algumas ações já foram executadas como o caso de medidas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos, SAXS, Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS) de Campinas, em misturas de BSA e surfactante em condições experimentais mercaptoetanólicas. No entanto, o que deve ser desenvolvido ainda é o tratamento dos dados de SAXS que, necessariamente, a candidata tem de se deslocar por um tempo longo ao Departamento de Física Aplicada da Universidade de São Paulo, junto ao grupo de pesquisa da Professora Rosângela Itri. Salienta-se que a Professora já colabora conosco, existem já vários trabalhos em conjunto e ela tem conhecimento sobre as técnicas de tratamento de dados

Referências Bibliográficas

1. Goddard, E.D., and Ananthapadmanabhan, K.P., Interactions of surfactantes with Polymers and Proteins, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.
2. SHAW, D. J. Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies; tradução: Maar, J. H. São Paulo: Edgard Blücher, 1975.
3. LIMA, F. Claudio. Investigação de complexos mistos Polímeros-surfactantes . Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis.
4. SANTOS, S. F. Interação entre o hialuronato e Surfactante Catiônico: Propriedades Catalíticas e Físico-Químicas. Dissertação de Mestrado em Química, UFSC, Florianópolis, 1993.
5. MARCONI, D. M. O. Efeitos de Micelas Aniônicas Funcionais e Inertes e de Pré-Agregados Micelares sobre as Reações de Hidrólise do Anidrido Benzóico e de Alcanoatos de 2,4-Dinitrofenilina. Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis, 1995.
6. RABOCAI, T. Físico-Química de Superfície. Washington: Organização dos Estados Americanos, 1979.
7. Gruen, D.W.R. The standard picture of ionic micelles. Prog. Colloid Polym. Sci., 70: 6. 1985.
8. HOLMBERG, K. Et al. Interactions between a lipase and charged surfactants – a comparison between bulk and interfaces. Advances in colloid and interface science 88 (2000) 223 – 241.
9. QUINA, F.H. & CHAIMOVICH, H. Ion exchange in micellar solutions. 1. Conceptual framework fi ion exchange in micellar solutions. J. Phys. Chem., 83: 1844-1850, 1979.
10. Gelamo, E.L., Silva, C.H.T.P., Imasato, H., Tabak, M. Interaction of bovine (BSA) and human(HSA) serum albumins with ionic surfactants: Spectroscopy and modelling. BBA, 1594, 84-99 (2002).

11. Turro, N. J., Ananthapadmanabhan, K. P., Lei, X. G., and Aronson, M. Spectroscopic probe analysis of protein-surfactant interactions: the BSA/SDS system. Langmuir 11, 2525 (1995).
12. Reynolds, J. A., and Tanford, C. Binding of dodecyl sulfate to proteins at higher ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. 66, 1002 (1970).
13. Guo, X. H., Zhao, N. M., Chem, S. H., and Teixeira, J. Small-angle neutron scattering study of the structure of protein/detergent complexes. Biopolymers 29, 335 (1990).
14. SCHWUGNER, M. And BARTNIK, F. G. Interaction of Anionic Surfactant With Proteins, Enzymes and Membranes – Anionic Surfactant. Edited by Christian Gloxhuber, New York, v.10, 1980.
15. ZANETTE, D. et al. Polymer-surfactant interactions demonstrated by a Kinetic probe: degree of ionization. Colloids and Surfaces 108(1996) 91 – 100.
16. ZANETTE, D. et al. Intractions of anionic surfactants with poly(etylene oxide) and bovine serum albumin polymers: effect of the couterion hydrophobicity. Colloids and Surfaces 147(1999) 89 – 105.
17. YAMASAKI, M. et. al. Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin IV. Effect of anionic surfactants with various lengths of hydrocarbon chain. International Journal of Biological Macromolecules 19 (1996) 241 – 246.
18. ZANETTE, D. et al. Salt effects on the interaction of poly(etylene oxide) and sodium dodecyl sulfate measured by conductivity. Colloids and Surfaces 113 (1996) 237–246.
19. Zanette, D., Santos, F.S.; Itri, R., Saturation conditions of bovine serum albumin (BSA) in association with sodium dodecyl sulfate (SDS). XV Conference *European Colloid and Interface Society*, 028(2001)
20. Santos, S., Zanette, D., Fischer, H., Itri, R., A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. J. Colloid Interface Sci. 2620 (2003) 400-408.
21. Díaz, X., Abun, E., Lissi, E.; Quenching of BSA intrinsic fluorescence by alkylpyridinium cations. Its relationship to surfactant-protein association. J. of Photochem. and Photobio. A6176 (2002) 1- 6

22. Zanette, D., Frescura, V., Ideal Mixing of Polymer-Surfactant Complexes of Polyethylene Oxide and Sodium Dodecyl Sulfate Plus Sodium Dodecanoate. Colloids and Surfaces 213(1999) 379 – 385.
23. Shinagawa, S., Kameuama, K., Takagi, T., Effect of salt concentration of buffer on the binding of sodium dodecyl sulfate and on the viscosity behavior of the protein polypeptide derived from bovine serum albumin in the presence of the surfactant. Bichimica et biophysica Acta, 1161 (1993) 79 – 84.
24. GERBANOWSKI, A., RABILLER, C., GUEGUEN, J., Behaviors of bovine serum albumin and rapessed proteins at the air/water interface after grafting aliphatic or aromatic chains. J. of colloid and interface science, in press
25. Lundahl, P., Greijer, E., Sandberg, M., Cardell, S. and Eriksson, K.O. (1986) Biochim. Biophys. Acta 873, 20-26.
26. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence spectroscopy; New York: Plenum Press, 1983.
27. R. Itri, L. Q. Amaral, Phys. Rev. E, 47, 2551 (1993);
28. G. Imokawa, K. Samura, M. Katsumi, J. Am. Chem. Soc. 52, 484 (1975);
29. M.J. Schwuger, J. Colloid Interface Sci., 43 (1973) 491
30. CAVALLI, V. Estudos de fluorescência de corantes solvatocrômicos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.
31. Turro, Yetka, J. Am. Chem. Soc. 100, 4951 (1978)
32. H. Durchschlag, K. J. Tiefenbach, S. Gebauer, R. Jaenicke, J. Mol. Struct., 563-564 (2001) 449-455.
33. C. Kim, Y. Hieh, Colloids and surfaces A, 187-188 (2001) 385-397
34. Dickinson, E.- Proteins in Solution and at Interface, ch.7, 1993.
35. Tanford, C., Reynolds, J. A., The Gross Conformation of Protein-sodium dodecylsulfate Complexes. Journal of Biological Chemistry. V.245, N.19 (1970)
36. O. Glatter and O. Kratky, “*Small Angle X-ray Scattering*” (Academic Press: London, 1982).

